

Analoge des Pantetheins,
des Pantetheinphosphats und des
Dephospho-Co-A.

von

KLAUS BEAUCAMP

Analoge des Pantetheins,
des Pantetheinphosphats
und des Dephospho-Co-A.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt
von
Klaus Beaucamp
aus München



Berichterstatter: Professor Dr. F. L y n e n
Tag der mündlichen Prüfung: 25. Juni 1958

Meinen lieben Eltern in
Dankbarkeit zugeeignet

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Mai 1956 bis Februar 1958 unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. Feodor L y n e n im Biochemischen Institut der Universität München ausgeführt.

Besonders herzlich möchte ich meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. F. L y n e n für die vielfachen Anregungen und Hinweise, sowie für das mir allzeit entgegengebrachte Wohlwollen danken.

I n h a l t

	Seite
Einleitung	1
Problemstellung	5
Ergebnisse	10
Aufbau der Pantothensäureanalogen	10
Bisnor- α -desoxypantothensäure	12
Bisnorpantothensäure	12
α -Desoxypantothensäure	15
Aufbau der Analogen des Pantetheins	20
S-Benzoyl-bisnor- α -desoxypantethein	20
Bisnor-pantethein	22
S-Benzoyl- α -desoxypantethein	24
Aufbau der phosphorylierten Pantetheinanalogen ...	28
S-Benzoyl-bisnor- α -desoxypantethein-4'-phosphat	29
S-Benzoyl-bisnorpantethein-4'-phosphat	30
S-Benzoyl- α -desoxypantethein-4'-phosphat	32
Aufbau zur Stufe des Dephospho-CoA	33
S-Benzoyl-bisnor- α -desoxydephospho-CoA	37
S-Benzoyl-bisnordephospho-CoA	47
Versuch zum Aufbau eines Analogen des Coenzym-A ..	51
Versuche über die Affinität der Analogen zu CoA- abhängigen Enzymen	53
Ausführung der Versuche und Messergebnisse	59
Zusammenfassung	81

Literaturverzeichnis

Lebenslauf

Verwendete Abkürzungen

AMP	=	Adenosin-5'-phosphat
ADP	=	Adenosin-5'-diphosphat
ATP	=	Adenosin-5'-triphosphat
NMN	=	Nikotinsäuremononukleotid
DPN	=	Diphosphorpyridinnukleotid
DPNH ₂	=	Diphosphorpyridinnukleotid, reduziert
TPN	=	Triphosphorpyridinnukleotid
TPNH ₂	=	Triphosphorpyridinnukleotid, reduziert
FMN	=	Flavinmononukleotid
FAD	=	Flavinadenindinukleotid
FADH ₂	=	Flavinadenindinukleotid, reduziert
DAPP	=	Diadenosinpyrophosphat
LBF	=	Lactobazillus-Bulgaricus-Faktor
VNP	=	Verzögerte Nitroprussid-Reaktion
Co-A	=	Coenzym-A
UMP	=	Uridylmonophosphat
UDP	=	Uridyldiphosphat
UTP	=	Uridyltriphosphat
GMP	=	Guanosinmonophosphat
GDP	=	Guanosindiphosphat
GTP	=	Guanosintriphosphat
CTP	=	Cytidyltriphosphat
CDPCh	=	Cytidyldiphosphatcholin
UDPG	=	Uridindiphosphatglucose
PP	=	anorg. Pyrophosphat
DCC	=	Dicyclohexylcarbodiimid

E i n l e i t u n g

Die Bedeutung der Vitamine als Nahrungszusatzstoffe für Tiere und Mensch zeigte sich zunächst in Krankheiten, die beim Fehlen dieser Stoffe in verschiedenen Formen und Überschneidungen auftraten. Der Beweis für die Existenz solcher Nährstoffe wurde durch die Versuche H o p k i n s erbracht, mit denen er zeigen konnte, dass eine kalorisch ausreichende, gereinigte Diät das Wachstum junger Ratten nur dann zu fördern vermochte, wenn ihr eine kleine Menge Milch zugesetzt wurde. Im Laufe der Zeit gelang es, viele Vitamine zu isolieren, ihre Struktur aufzuklären und durch Synthese zu beweisen.

Man machte weiter die Erfahrung, dass viele Wuchsstoffe, die von Mikroorganismen benötigt wurden, mit Vitaminen identisch sind, und dass die zuerst strenge Definition, Vitamine seien Wirkstoffe, die den höheren Organismen zugeführt werden müssen, da sie sie selbst nicht aufbauen können, nicht völlig zutrifft. Es hat sich nämlich herausgestellt, dass bestimmte Warmblüter durchaus in der Lage sind, einzelne Vitamine selbst aufzubauen, wenn auch nicht in der für den normalen Bedarf ausreichenden Menge. Als Beispiele seien die Ascorbinsäure und das Nikotinsäureamid genannt.

Bei der Untersuchung der Wirkungsweise der Vitamine im Körper zeigte es sich, dass sie weitgehend als Bausteine von Cofermenten verwendet werden und auf diesem Wege in Stoffwechselvorgänge eingreifen.

Diese Erkenntnis vermittelten erstmals die Arbeiten W a r b u r g s und K u h n s. W a r b u r g (1)(2) hatte bei der Untersuchung des gelben Fermentes ein kristallisiertes Produkt erhalten, das durch Bestrahlung der Farbstoffkomponente des Fermentes entstanden war und hatte das Produkt Lumiflavin genannt. K u h n (3) isolierte aus Molke einen gelben Farbstoff, den er Laktoflavin nannte

und der bei Belichtung in das von W a r b u r g beschriebene Lumiflavin übergang. Damit war der Zusammenhang hergestellt und die biochemische Funktion des Laktoflavins bezeichnet. Seither wurden weitere Vitamine in Cofermenten wiedergefunden.

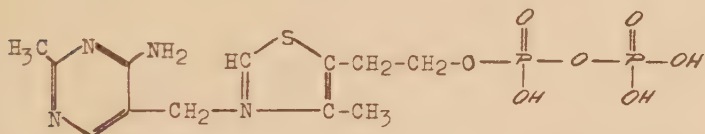
So wurde man bei der Untersuchung der Sulfonamidtherapie auf einen Faktor aufmerksam, der das nach Gabe des Pharmakons gehemmte Wachstum von Bakterien wieder in Gang zu bringen vermochte. W o o d s (4) isolierte diesen Faktor und identifizierte ihn als p-Aminobenzoesäure (Vitamin H'). Diese konnte auch im Tierversuch die bactericide Wirkung der Sulfonamide aufheben. Das Vitamin wird in die Folsäure eingebaut. Aus der zunehmenden Kenntnis der Wirkung der Folsäure als wesentliches Coferment des C₁-Körperstoffwechsels ergibt sich die Bedeutung des Vitamins H'.

Eine Reihe von Vitaminen des B-Komplexes treten als phosphorylierte Verbindungen in Cofermenten auf. So kennt man das Vitamin B₁ (Aneurin, Thiamin) im Thiaminpyrophosphat als Coferment der einfachen Decarboxylierung der Brenztraubensäure zu Acetaldehyd oder ihrer oxydativen Decarboxylierung zu Acetat. Thiaminpyrophosphat ist auch Katalyt bei der Oxydation von α -Ketoglutarat zu Succinat, einer Reaktion, die in den Citronensäurecyclus, den fundamentalen Oxydationsprozess der Zelle eingeschaltet ist. Weiterhin konnte die Beteiligung dieses Coferments in der Transketolasereaktion sichergestellt werden.

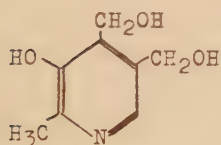
Pyridoxin (Vitamin B₆) wurde als wesentlicher Wachstumsstoff für Tiere und Mikroorganismen erkannt. S n e l l entdeckte dann seine Derivate Pyridoxamin und Pyridoxal, die eine wesentlich stärkere Wachstumswirkung zeigten, als das Vitamin selbst (5)(6). Es waren schließlich die Arbeiten von G u n s a l u s (7), S n e l l (8) und B r a u n s t e i n (9), die zu dem Ergebnis führten, dass Pyridoxamin- und Pyridoxal-phosphat die eigentlichen Cofermente der Transaminierungs- und Decarboxylierungsreaktionen des Aminosäurestoffwechsels sind. Damit war auch die Bedeutung dieses Vitamins geklärt.

Als weitere Beispiele sollen das Nikotinsäureamid und das bereits oben erwähnte Laktoflavin (Vitamin B₂) genannt sein, die in die Coenzyme der - seit W a r - b u r g s grundlegenden Arbeiten besonders eingehend untersuchten - Wasserstoff übertragenden Enzyme eingebaut werden.

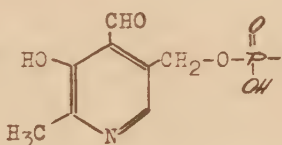
Im folgenden Bild sollen diese Beziehungen an Hand der Formeln deutlich gemacht werden.



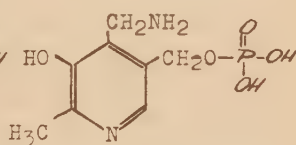
(Thiamin-) Aneurin — — — — — PYROPHOSPHAT



Pyridoxin



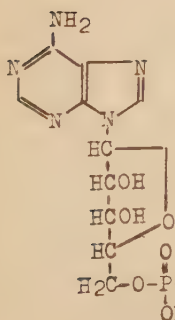
Pyridoxal-**PHOSPHAT**



Pyridoxamin-**PHOSPHAT**

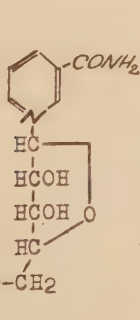


Pteroylglutaminsäure (Folsäure)



DPN

NIKOTINSÄUREAMID

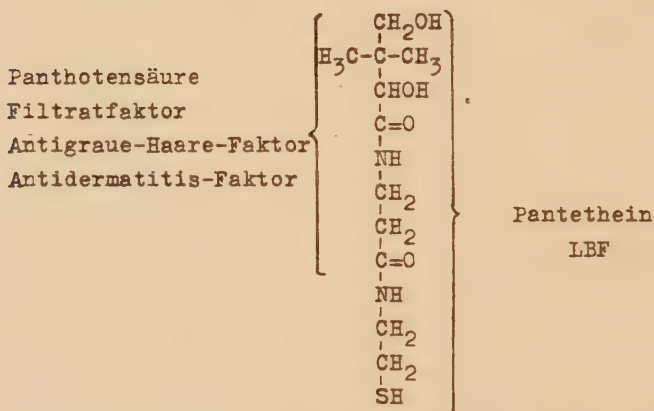


FAD

RIBOFLAVIN

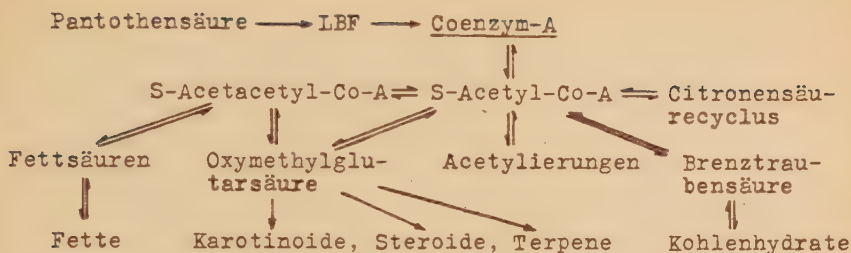
Bei der Pantothersäure liegen die Verhältnisse ähnlich. Sie wurde schon lange als wichtiger Wuchsstoff für verschiedene Tiere (Ratte, Huhn) erkannt (10). Ihr Mangel führt bei manchen Pelztieren zum Ergrauen der Haare (Antigraue-Haare-Faktor) (11) oder zu Dermatitis (12).

In späteren Arbeiten wurden die Bausteine der Pantothersäure, das β -Alanin und das α -Oxy- β , β -dimethyl- γ -butyrolakton im sogenannten Laktobacillus-Bulgaricus-Faktor (LBF) wiedergefunden (13), der sich durch einen weiteren Baustein, das Cysteamin, von der Pantothersäure unterscheidet.



Seit der Entdeckung des Coenzym-A durch N a c h m a n - s o h n (14) und L i p m a n n (15) und seiner Struktur- aufklärung durch L i p m a n n (16) ist der wesentliche Bestimmungsort des Vitamins Pantothersäure in diesem Coenzym erkannt. Die Bedeutung der Pantothersäure als Baustein des Coenzym-A soll in dem folgenden Schema (s.S.5) angedeutet werden, das seine zentrale Stellung im Stoffwechsel zeigt.

Aus dieser Stellung des Coenzym-A als Bindeglied zwischen Fettsäure- und Kohlenhydratstoffwechsel, als Brücke zum Citronensäurecyclus und aus seiner Mitwirkung bei der Steroidsynthese können die vielfältigen, durch Pantothersäuremangel hervorgerufenen Schäden an Organismen erklärt werden.

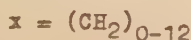
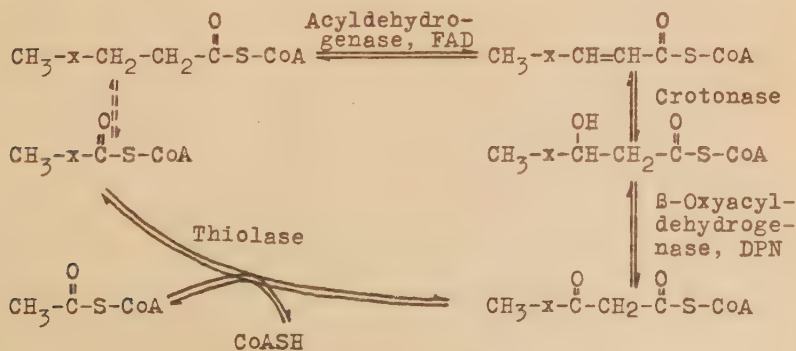


Problemstellung

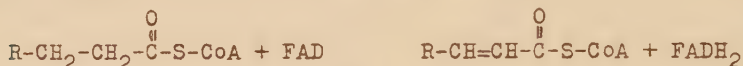
Wie in der Einleitung gesagt, greift das Coenzym-A in eine Reihe von Stoffwechselvorgänge ein, indem es Acylreste für auf- oder abbauende Umsetzungen aktiviert. Dabei geht jeweils die Acylgruppe der Säure mit der SH-Gruppe des Coenzyms eine energiereiche Thioesterbindung ein (17):



wobei die zur Bildung dieser Bindung nötige Energie den energieliefernden Reaktionen des Stoffwechsels entnommen wird (18). Aus dieser energiereichen Thioesterbindung können nun auf dem Wege der Gruppenübertragung andere Bindungen aufgebaut werden. Dabei werden sehr unterschiedliche Substrate gebunden und übertragen. Man denke an die Synthese der Fettsäuren aus Acetat (20), wobei Kohlenstoffketten verschiedenster Längen - von C_2 - C_{18} - an das Coenzym gebunden in die Reaktionen einbezogen werden.

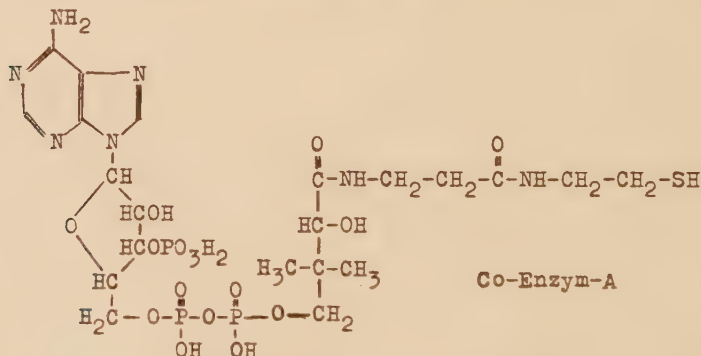


Jede dieser Umsetzungen bedarf eines besonderen Enzyms. Zudem werden bei einzelnen Reaktionsschritten des Fettsäurecyclus von einem Enzym nur Moleküle ganz bestimmter Kettenlänge umgesetzt. So sind bei der Reaktion:



drei Fermente nötig (19), wenn der Cyclus von C_{18} bis C_2 , also achtmal durchlaufen werden soll: die Lauryl-dehydrogenase (C_{18} - C_8), die Capryl-dehydrogenase (C_{14} - C_6) und die Butyryl-dehydrogenase (C_8 - C_2).

Nun ist durchaus denkbar, dass die Vielzahl der Fermente, denen das Coenzym-A als Cofaktor zugeordnet ist, seine komplizierte Struktur notwendig machen (16).



Bei den einzelnen enzymatischen Reaktionen, die unter Beteiligung von Coenzym-A ablaufen, wurde ein sehr weitgehender Spezifitätsunterschied bezüglich des Coenzym festgestellt. So kann bei einzelnen Stufen des Fettsäurecyclus das Coenzym-A durch N-Acetylcysteamin ersetzt werden (21)(22), während die Phosphotransacetylaserreaktion so spezifisch für das Coenzym-A ist, dass sie zu seiner quantitativen Bestimmung verwendet wird (23).

Auch bei der Biosynthese des Coenzym-A scheint eine ausgeprägte Spezifität bezüglich der „Bausteine“ vorzuliegen. So könnte man die von Reichstein (24), Mitchell (25) und Weinstock (26) durchgeführten Wachstumsversuche an Mikroorganismen dahingehend deuten, dass die von den Autoren angebotenen Analogen der Pantothe-

thensäure nicht zur Stufe des Coenzym-A aufgebaut werden, was in der Folge zu einer weitgehenden Einschränkung des Stoffwechsels führt.

K a p l a n et al. (27) berichteten über Versuche mit Analogen des DPN. Sie fanden, dass 3-Acetylpyridin durch eine Diphosphopyridin-nukleotidase aus Schweinehirn in das dem DPN entsprechende Dinukleotid eingebaut wird. Bei der Untersuchung der enzymatischen Wirkung dieses DPN-Analogen konnten die Autoren bei der Alkoholdehydrogenase eine, wenn auch stark reduzierte Aktivität feststellen. H u g h e s (28) berichtete, dass 5-Fluornikotinsäure das Wachstum einiger Bakterien völlig hemmt, obwohl sie - wie gezeigt werden konnte - durch Strept. faecalis in Flournikotinamid umgewandelt wird.

Schließlich stellte der Arbeitskreis um K a r r e r (29) schon 1936 fest, dass beim Riboflavin die Methylgruppen in 6- und 7-Stellung von Bedeutung sind und dass ihre Entfernung fast völligen Aktivitätsverlust bewirkt.

Betrachten wir nun den Pantetheinteil des Coenzym-A, so fällt neben der für alle Umsetzungen als wesentlich erkannten SH-Gruppe (17) unter anderem die α -OH-Gruppe auf. Ob hier ein wichtiger Angriffspunkt bei der Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes vorliegt, müsste sich bemerkbar machen, wenn die Gruppe aus dem Molekül entfernt wird. Darüber hinaus könnte versucht werden, die Bedeutung der beiden B-ständigen Methylgruppen zu erkennen, wenn man ein Molekül synthetisiert, in dem diese Gruppen fehlen. Eine Abwandlung des Moleküls in diesem Sinne sollte also - wenn die genannten Gruppen als Bindungsträger an das Enzym von Bedeutung sind - zu einem Abfall der Affinität führen, was sich durch eine Verlangsamung oder durch das Ausbleiben der Reaktion feststellen ließe.

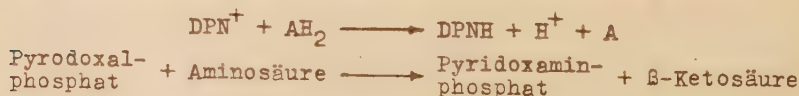
Dabei darf Folgendes nicht übersehen werden: Während bei der Pantothensäure durch Entfernung einer OH-Gruppe das Molekül schon wesentlich verändert ist, könnte dieselbe Operation etwa beim Pantetheinphosphat oder beim

Coenzym-A ohne oder von geringerer Wirkung sein, da beim Aufbau des Coenzym in zunehmendem Maße neue funktionelle Gruppen eingeführt werden. Man denke an die stark polaren Phosphatgruppen oder an die Aminogruppe des Adenins, die im Enzym-Substrat-Komplex eine bedeutende Rolle spielen und eine fehlende α -OH-Gruppe kompensieren könnten.

Allerdings zeigten neuere Arbeiten von H. K l e n o w (30)(31), dass schon geringe Änderungen an einem Coferment dessen Wirkung wesentlich beeinflussen können. Die Autoren bauten enzymatisch mittels „Deoxy-ATP“ - die Ribose war durch 2-Desoxyribose ersetzt - und Nikotinsäureamid-mononukleotid „Desoxy-DPN“ auf und fanden, wenn sie dieses in Dehydrierungsreaktionen einsetzten, eine 50 - 60 fache Verlangsamung des Umsatzes.

Dazu ist zu sagen, dass der Mechanismus einer Reaktion im Enzym-Substrat-Komplex in den meisten Fällen völlig undurchsichtig ist. In einigen wenigen Reaktionen konnte in der letzten Zeit eine Erklärung gegeben werden. So haben K a p l a n et al. (32), sowie W a l l e n f e l s und S u n d (33) die Wirkungsweise der Alkoholdehydrogenase unter der Beteiligung von DPN und Zink aufklären und einen einleuchtenden Vorschlag für den Mechanismus machen können. Weiterhin konnten die Arbeitskreise um S n e l l (34) und B r a u n s t e i n (9) den Wirkungsmechanismus der von Vitamin B₆ katalysierten Reaktionen der Transaminierung aufklären. Er besteht in der Bildung einer Schiff'schen Base zwischen Pyridoxalphosphat und der Aminogruppe bzw. zwischen Pyridoxaminphosphat und Ketogruppe mit anschließender Elektronenverschiebung und hydrolytischer Spaltung des umgelagerten Coenzym-Substrat-Komplexes.

Bei den eben besprochenen Beispielen werden die Coenzyme in die Reaktion mit einbezogen und dabei selbst verändert:



Bei den Reaktionen, die unter Beteiligung des Coenzym-A ablaufen, erfolgt eine Veränderung des Coenzym in der Art, dass nach L y n e n (17) das Substrat mit seiner Acylgruppe an die SH-Gruppe gebunden wird, um dann über die gebildete, energiereiche Thioesterbindung das Substrat zu aktivieren.

Mit Ausnahme der SH-Gruppe des Coenzym-A sind also alle anderen Gruppen als potentielle Bindungsvermittler zum Enzym anzusehen, wobei die Möglichkeit besteht, dass für verschiedene Enzyme jeweils verschiedene Gruppenkombinationen diese Aufgabe erfüllen.

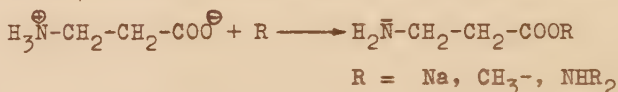
Im Folgenden sind Synthesen beschrieben, die, ausgehend von den entsprechenden Laktonen, zu Analogon des Pantetheins, des Pantethein-4'-phosphats und des Dephospho-coenzym-A führen. Die erhaltenen Produkte werden in enzymatischen Versuchen eingesetzt, um aus dem Ablauf der Reaktionen einen Hinweis zu finden, inwieweit die α -OH-Gruppe und die β -Methylgruppen der Pantothersäure von Bedeutung sind.

E r g e b n i s s e

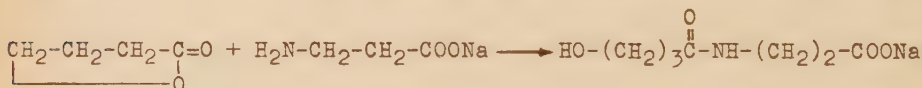
Aufbau der Pantothensäureanaloge.

1943 gab W i l l i a m s , der selbst wesentlich an der Entwicklung beteiligt war, einen Überblick über die Panto-
thensäuresynthesen (35). B a r n e t t stellte eine Reihe
von Analogon der Pantothensäure her, um deren Vitaminwirkung
zu prüfen (36)(37).

Prinzipiell ist es dabei nötig, die Zwitterionstruktur
des β -Alanins aufzuheben, was durch Salzbildung an der Carb-
oxylgruppe oder durch deren Veresterung erfolgen kann:



Dabei wird der Ammoniumstickstoff in einen Aminstick-
stoff überführt, der auf Grund seines stark basischen Charak-
ters das Laktone unter Bildung der Säureamidgruppierung öffnet:



Die freien Säuren werden dann durch Hydrolyse der Ester
oder durch Ansäuern der Salze erhalten.

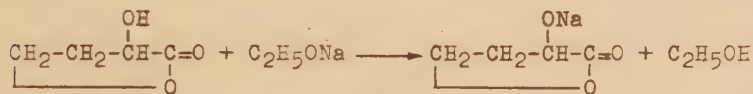
Ester des β -Alanins wurden erstmals von W i l l i a m s
et al. (38), R e i c h s t e i n und G r ü s s n e r (24),
K u h n und W i e l a n d (39), sowie S t i l l e r
et al. (40) verwendet, während die Synthesen aus dem Natrium-
salz des β -Alanins von W i l l i a m s (38), B a b c o c k
und J u k e s (41) und B a r n e t t (42) durchgeführt
wurden.

W i l l i a m s arbeitete ohne Lösungsmittel und erhielt
das Natriumsalz der Pantothensäure als harte, hygroscopische
Substanz, während B a r n e t t die Umsetzung der Laktone
mit dem Natriumsalz des β -Alanins in absolutem Methanol durch-

Am besten geeignet erschien hierfür die von B a d d i - l e y (48) bei der Synthese des Pantetheinphosphats benutzte Verätherung mit Benzylalkohol, da sich Benzyläther durch Natrium in flüssigem Ammoniak reaktiv spalten lassen. Zur Darstellung des Benzyläthers hatte B a d d i - l e y das α -Natriumalkoholat des Pantolaktens mit Benzylchlorid in Xylol umgesetzt und dabei in guter Ausbeute das gewünschte Produkt erhalten.

Der Versuch, diese Methode auf das α -Oxy- γ -butyrolakton zu übertragen, führte nicht zum Erfolg.

Zunächst setzte ich das Lakton nach der B a d d i - l e y schen Vorschrift mit Natriumäthylat um:



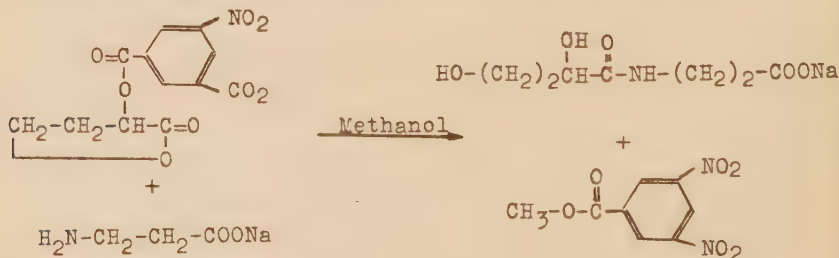
Diese Behandlung führte aber zur Wasserabspaltung in 2-3-Stellung und in deren Folge zu einer Polymerisation, wie die nach der Aufarbeitung verbleibende, zähe Schmiere zeigte. Diese unerwünschte Reaktion konnte beim Pantolakton wegen der β -ständigen Methylgruppen nicht erfolgen.

Auch die Behandlung des α -Brom- γ -butyrolaktens mit Natriumbenzylat führte, offenbar unter Bromwasserstoffabspaltung und Polymerisation, zu starker Verharzung. Bei dem Versuch, die Umsetzung des Laktens mit Benzylchlorid in Pyridin, vorzunehmen, konnte ich unter diesen milderer Bedingungen nur die Ausgangsmaterialien isolieren.

Eine weitere Möglichkeit bestand darin, die Verätherung mit Phenylldiazomethan zu versuchen, das sich nach C u r - t i u s und F r a n z e n (49) aus Benzalhydrazin durch Oxydation mit Quecksilberoxyd erhalten lässt. Beim Zutropfen der roten Lösung vom Phenylldiazomethan in Petroläther zu einer Emulsion des Laktens in Petroläther trat auch erwartungsgemäß unter Entfärbung Gasentwicklung auf. Bei der Aufarbeitung des Reaktionsgemisches wurde durch Destillation im Hochvakuum eine Fraktion isoliert, die zu

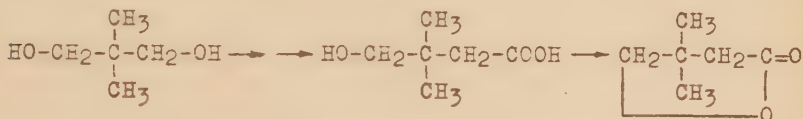
gelben Kristallen vom Schmelzpunkt 92°C erstarrte. Die qualitative Analyse ergab jedoch, dass die kristallisierte Substanz Stickstoff enthielt. Sie konnte als Benzaldazin (Smp. 93°C) identifiziert werden, das auch bei der Darstellung des Benzalhydrazins nach S t a u d i n g e r (50) als Nebenprodukt entstanden war. Der gewünschte Benzyläther des α -Oxy- γ -butyrolaktone konnte nicht gefunden werden.

Eine weitere Möglichkeit bot die Veresterung mit 3,5-Dinitrobenzoesäure (51). Durch die beiden Nitrogruppen wird die Esterbindung so weitgehend labilisiert, dass zur Spaltung keine drastischen Bedingungen notwendig sind. Durch Veresterung des α -Oxy- γ -butyrolaktone mit 3,5-Dinitrobenzoylchlorid nach Schotten-Baumann ließ sich auch tatsächlich mit guter Ausbeute das schön kristallisierende, hellgelbe α -Dinitrobenzoat vom Schmelzpunkt 135°C isolieren. Beim Versuch, die Verbindung mit dem Natriumsalz des β -Alanins in Methanol zum Pantothensäureanalogen umzusetzen, lief jedoch eine Umesterung ab und es konnten als Reaktionsprodukte nur 3,5-Dinitrobenzoesäuremethylester und Bisnorpantothensäure gefasst werden:

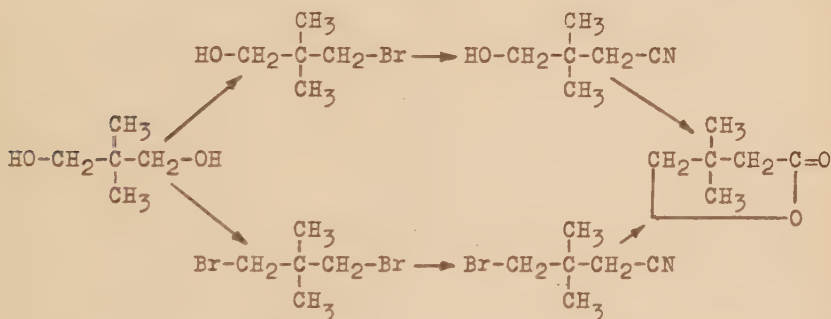


Nach diesen Misserfolgen wurde auf den Schutz der α -OH-Gruppe ganz verzichtet und das angestrebte Ziel, die selektive Phosphorylierung der γ -OH-Gruppe des Bisnorpantetheins zu erreichen, auf einem anderen Wege verfolgt. Die dafür benötigte Bisnorpantothensäure ließ sich durch Umsetzung des α -Oxy- γ -butyrolaktone mit dem Natriumsalz des β -Alanins nach der Vorschrift von B a r n e t t in guter Ausbeute erhalten.

Das zur Synthese der α -Desoxypantothenensäure benötigte 2,6-Dimethyl- γ -butyrolakton war auf zwei Wegen zugänglich. Der erste Weg, wobei die Kohlenstoffkette verlängert wurde, ging von Neopentylglycol ⁺) aus. Zur Überführung in die gewünschte Verbindung war nur die Einführung der Carboxylgruppe in C₁ erforderlich:



Das wird erreicht durch Umsetzung des 1-Brom-neopentanol-3 oder 1,3-Dibromneopentans mit stöchiometrischer Menge Cyanid und anschließender Verseifung des gebildeten Nitrils, was direkt zum Lakton führt.



Der zweite Weg zur Herstellung des Laktons besteht in einer Kettenverkürzung.

Die Darstellung substituierter Laktone durch Einwirkung von Halogen auf die Silbersalze von Dicarbonsäuren beschrieben bereits K o m p p a (52) 1899, W i n d a u s (53) 1921, sowie S i r c a r (54) 1928. Die Anwendung dieser Methoden führte in vielen Fällen zu unbefriedigenden Ergebnissen. Einmal sind die als Ausgangsmaterial dienenden sub-

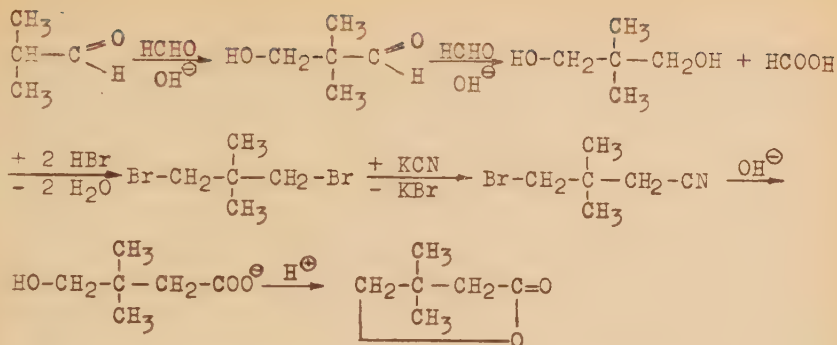
⁺) Der Firma Eastman, Kingsport, Tennessee, möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung einer Probe Neopentylglycol danken.

stituierten Dicarbonsäuren oft nur schwer zugänglich, zum anderen läuft die Verkürzung der C-Ketten fast durchweg mit schlechter Ausbeute ab. Die von H u n s d i e c k e r (55) 1942 entwickelte Abbaumethode, die allgemein anwendbar ist und mit recht guten Ausbeuten verläuft (50-60 %), brachte eine wesentliche Verbesserung des Verfahrens. Die Verkürzung der C-Kette wird bei dieser Methode durch Behandlung des Silbersalzes einer Carbonsäure mit Brom in trockenem Tetrachlorkohlenstoff erreicht:



Um zu einem Lakton zu gelangen, geht man von einer Dicarbonsäure aus, deren eine Carboxylgruppe durch Veresterung der Salzbildung und nachfolgenden Decarboxylierung entzogen wird. Man kommt somit im Zuge des H u n s d i e c k e r -Abbaus zum ω -Bromsäureester, der durch alkalische Verseifung und anschließendes Ansäuern direkt das Lakton liefert.

Die beiden Wege, auf denen ich die Herstellung des β,β -Dimethyl- γ -butyrolaktons versuchte, seien im Folgenden kurz skizziert. Zunächst behandelte ich Neopentylglycol, das sich nach W h i t m o r e (56) aus Isobutyraldehyd und Formaldehyd gewinnen ließ, mit Bromwasserstoff, bis keine Gewichtszunahme mehr erfolgte. Das Reaktionsprodukt wurde destilliert, wobei ein zäher Rückstand, offenbar das durch intermolekulare Bromwasserstoffabspaltung entstandene Polymerisat, blieb. Das Destillat vom Siedepunkt $46-48^\circ\text{C}$ (12 mm Hg) - B e n d e r et al. geben für das β,β -Dimethyl-1,3-dibrompropan einen Sdp. von $63-65^\circ\text{C}$ (24 mm Hg) an (57) - wurde mit einem Äquivalent Kaliumcyanid umgesetzt. Die Reaktion verlief nur unvollständig und ergab bei der Destillation eine sehr geringe Menge des γ -Bromnitrils. Aus der Verseifung dieses Produktes in 50 %iger äthanolischer Kalilauge war das Salz der α -Oxy- β,β -dimethylbuttersäure zu erwarten, das beim Ansäuern in β,β -Dimethyl- γ -butyrolakton übergehen sollte.



Dieses Produkt konnte jedoch nicht gefasst werden.

In einem neuen Ansatz wurde Neopentylglycol nach einer Vorschrift von F r a n k e (58) im Bombenrohr mit rauchender Bromwasserstoffsäure erhitzt, wobei sich das Monobromid bildete. Dieses ist in der wässrigen Phase unlöslich und entzieht sich daher der weiteren Bromierung. Das durch zweimalige Destillation (Sdp. 72-77°C, 12 mm Hg) gereinigte Monobromid setzte ich mit Kaliumcyanid um und überführte das gebildete γ -Oxy- β,β -dimethylbutyronitril durch Verseifung in das gewünschte Laktone. Ein Nachteil dieses Syntheseweges, der mit guter Ausbeute verläuft, liegt darin, dass bei der Bromierung im Bombenrohr nur kleine Mengen Substanz umgesetzt werden können. Man muss nämlich mit einem großen Überschuss an Bromwasserstoffsäure arbeiten.

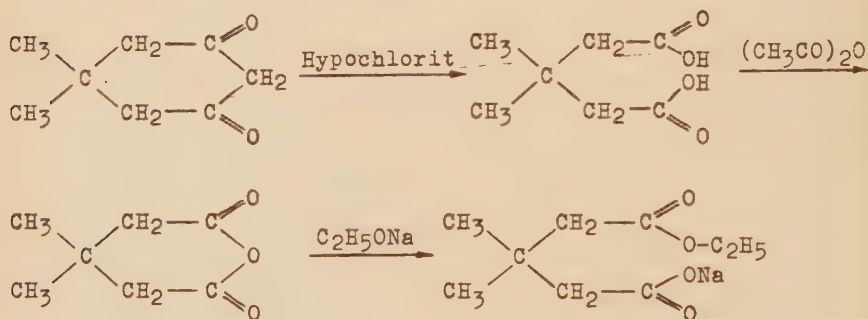
Ich versuchte deshalb den Weg über den Abbau von Dimethylglutarsäure nach H u n s d i e c k e r .

β,β -Dimethylglutarsäure ließ sich durch Oxydation von Dimedon^{†)} mit Hypochlorit in guter Ausbeute erhalten (59) und durch Kochen mit Essigsäureanhydrid in das β,β -Dimethylglutarsäureanhydrid überführen. Diese Reaktion verläuft praktisch quantitativ, da man durch Abdestillieren

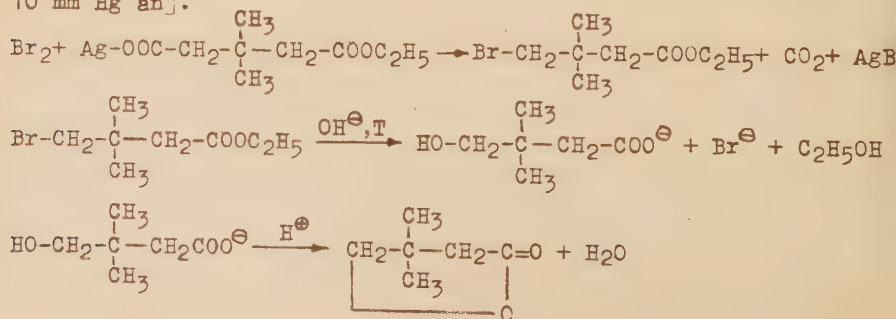
^{†)} Dimedon kann durch Kondensation von Mesityloxyd mit Malonester, anschließender Verseifung und Ringschluss erhalten werden.

der entstehenden Essigsäure das Gleichgewicht ganz auf die Seite des Glutarsäureanhydrids verschieben kann.

Beim Kochen des Säureanhydrids mit einer Lösung von Natriumalkoholat in Alkohol unter Rückfluss entstand fast quantitativ das Natriumsalz des β,β -Dimethylglutarsäuremonoäthylesters, das in das Silbersalz des β,β -Dimethylglutarsäurehalbesters übergeführt wurde. Dieses kristallisierte aus heißem Wasser in Form zarter, farbloser Nadelbüschel, die am Licht violett wurden.



Für die weitere Umsetzung des Silbersalzes nach H u n s - d i e c k e r ist ein absolut trockenes, zu Puder zermahlendes Silbersalz und absolut trockener Tetrachlorkohlenstoff Voraussetzung. Durch Berücksichtigung dieser Bedingungen fiel der β,β -Dimethyl- γ -brom-buttersäureäthylester in 64 %iger Ausbeute an, der nach der Verseifung quantitativ das β,β -Dimethyl- γ -butyrolakton lieferte (Sdp. $82-88^\circ\text{C}$, 12 mm Hg). [P a t t i s o n und S a u n d e r s (60) geben $79,3^\circ\text{C}$, 10 mm Hg an].



Zur Identifizierung wurde das Laktone in die Hydroxamsäure übergeführt, die den charakteristischen tiefvioletten Eisenchloridkomplex bildete und der Verbrauch an m/10 Natronlauge bei der Titration bestimmt. Die Umsetzung des Laktone mit Phenylhydrazin führte nicht zum Phenylhydrazid, was darauf schließen lässt, dass β,β -Dimethyl- γ -butyrolaktone reaktionsträger ist als α -Oxy- γ -butyrolaktone. Die geringere Reaktivität äusserte sich auch in der schlechten Ausbeute an Pantothen Säureanalogem bei der Umsetzung des Laktone mit dem Natriumsalz des β -Alanins in Methanol nach **B a r n e t t**. Fast quantitativ entstand dagegen das Natriumsalz der α -Desoxypantothen Säure, wenn Laktone und Natriumsalz des β -Alanins nach **W i l l i a m s** ohne Lösungsmittel auf 100°C erhitzt wurden.

Als analytische Methode zum Nachweis von Laktone ist die Überführung in die Hydroxamsäuren - wie sie oben erwähnt wurde - sehr geeignet. Man erhält diese durch Behandlung des Laktone mit alkalischer Hydroxylaminlösung



Bild 2. Chromatogramm der Hydroxamsäuren auf SS 2043b, Butanol, Wasser gesättigt, absteigend.

Laktone als Hydroxamsäure	Rf-Wert
I γ -Butyrolaktone	0,47
II α -Oxy- γ -butyrolaktone	0,28
III β,β -Dimethyl- γ -butyrolaktone	0,72
IV Pantolaktone	0,54

und kann sie durch die tiefrote Färbung ihres Eisenchloridkomplexes in saurem Milieu qualitativ nachweisen und quantitativ bestimmen. Vom Pantolakton (α -Oxy- β , β -dimethyl- γ -butyrolakton) und den drei anderen Laktonen stellte ich die Hydroxamsäuren dar. Sie wurden der Papierchromatographie unterworfen und nach dem Trocknen des Papiers mit salzsaurer Ferrichloridlösung nachgewiesen. Die einzelnen Hydroxamsäuren unterschieden sich deutlich. Ihr Rf-Wert wurde von dem Verhältnis der hydrophoben und hydrophilen Gruppen in der Molekel bestimmt, wie Bild 2 auf Seite 19 zeigt.

Aufbau der Analogen des Pantetheins

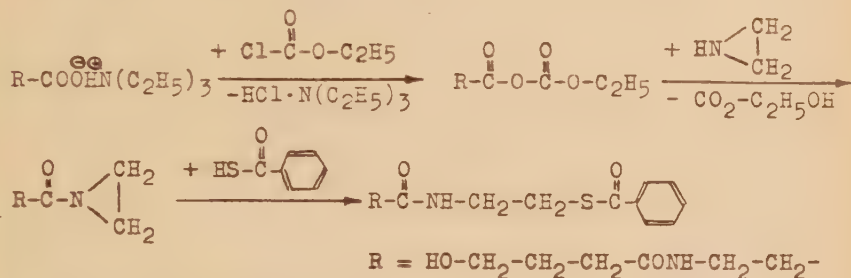
Wie bei der Pantotheinsäure, so sind auch bei der nächsten Stufe, dem Pantethein, eine Reihe von Synthesen bekannt, die von S n e l l und B r o w n (13) zusammenfassend beschrieben wurden. Von S c h w y z e r (61)(62) stammt eine elegante Methode, die direkt zum kristallisierten S-Benzoylpantethein führt.

Bei der Darstellung von Analogen des Pantetheins nützte ich das Kristallisationsvermögen der S-Benzoylverbindungen, das ihre Reinigung wesentlich erleichtert, aus. Ausserdem ermöglicht die charakteristische UV-Absorption der Thiobenzoate eine einfache quantitative Analyse. Zur quantitativen Bestimmung der Thiolester lässt sich auch die von L y n e n (63) beschriebene verzögerte Nitroprussidreaktion (VNP) heranziehen. Dabei wird der Thiolester in ammoniakalischer Lösung verseift und das freigesetzte Mercaptan durch die Rotfärbung von Nitroprussidnatrium kolorimetrisch bestimmt.

1) S-Benzoyl-bisnor- α -desoxypantethein.

Durch Umsetzen des Triäthylammoniumsalzes der Bisnor- α -desoxypantotheinsäure mit Chlorkohlensäureäthylester in Dimethylformamid nach der Vorschrift von W i e l a n d und B o k e l m a n n (64) erhielt ich das gemischte Anhydrid, das dann nach S c h w y z e r durch Zugabe von Äthylenimin in Bisnor- α -desoxypantotheryl-äthylenimid überging. Mit

Thiobenzoesäure entstand daraus S-Benzoyl-bisnor- α -desoxy-pantethein, das sich aus Essigester kristallisieren ließ (Smp. 120°C).



Papierchromatographisch erwies sich die Substanz als einheitlich (Rf-Wert 0,72)⁺. Das UV-Spektrum zeigt die für S-Benzoylverbindungen charakteristischen Maxima bei 240 und 268 m μ .

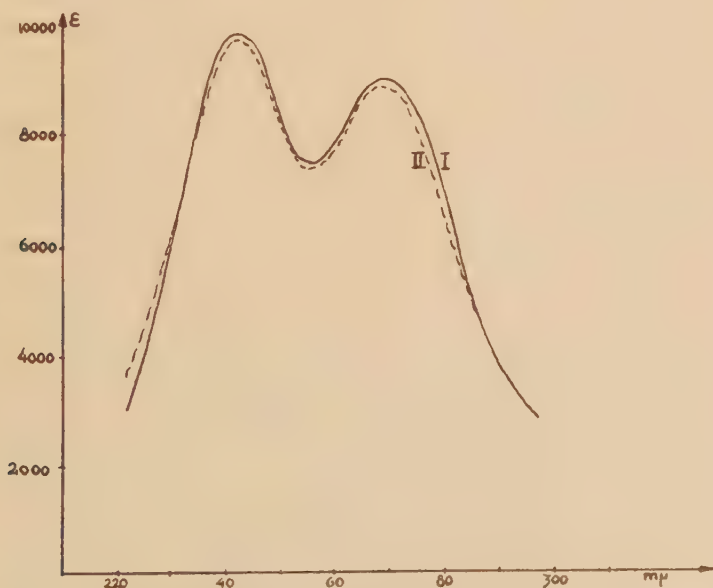


Bild 3. UV-Spektrum: Je 0,1 μ Mol/ml; m/10 Phosphatpuffer pH 7

I S-Benzoyl-bisnor- α -desoxypantethein

II S-Benzoyl-bisnor- α -desoxypantethein-4'-phosphat

⁺) absteigend auf SS 2043b, Lösungsmittel: m/10 sec. Natriumphosphat.

2) Bisnorpantethein.

Aus später zu erläuternden Gründen wurde für enzymatische Versuche nur eine kleine Menge Bisnorpantotheinsäure nach S c h w y z e r umgesetzt. Ich erhielt in guter Ausbeute β -Benzoyl-bisnorpantethein vom Schmelzpunkt 114°C , das durch Papierchromatographie, UV-Spektrum und Analyse identifiziert wurde.

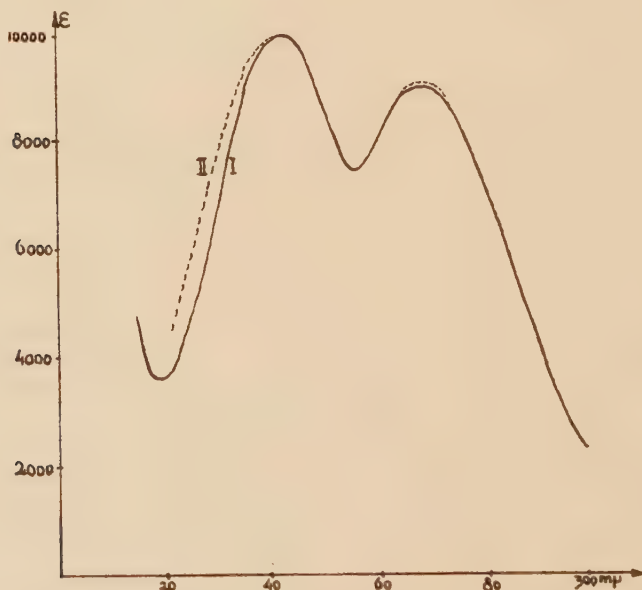
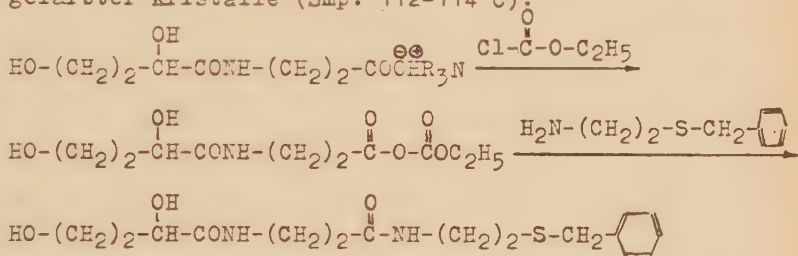


Bild 4. UV-Spektrum: Je $0,1 \mu\text{Mol/ml}$; $m/10$ Phosphatpuffer pH 7
I S-Benzoyl-bisnorpantethein
II S-Benzoyl-bisnorpantethein-4'-phosphat

Die Hauptmenge der Bisnorpantotheinsäure wurde nach der Vorschrift von B a d d i l e y (48) in S-Benzyl-bisnorpantethein übergeführt. Diese Synthese ist der S c h w y z e r sehr ähnlich, da man sich wieder des W i e l l a n d schen Anhydrids bedient, das in diesem Fall mit S-Benzylcysteamin umgesetzt wird.

Das benötigte S-Benzylcysteamin erhielt ich durch Behandeln von Cysteamin mit Benzylchlorid und anschließender Hochvakuumdestillation des vorgereinigten Produktes als farblose Flüssigkeit in guter Ausbeute (Sdp. 90-92°C, 0,01 mm Hg). Die weitere Umsetzung der Bisorpantothensäure gemäß folgender Gleichung erfolgte bei tiefer Temperatur und ergab ein gelbrotes Oel, das nach Zusatz von Äther fest wurde. Durch Umkristallisation aus Methanol erhielt ich S-Benzyl-bisorpantethein in Form schwach rosa gefärbter Kristalle (Smp. 112-114°C).



Ein aufsteigendes Papierchromatogramm^{†)} lieferte nur einen Fleck mit dem R_f-Wert 0,8. Zum Nachweis der Verbindung auf dem Papier diente verdünnte Permanganatlösung. Thioäther verbrauchen wie alle Verbindungen, die Schwefel in niedriger Oxydationsstufe enthalten, Permanganat, so dass nach Durchziehen des Papiers durch das Reagens an der Stelle der schwefelhaltigen Verbindung ein brauner Fleck sichtbar wird.

Zur Identifizierung des Pantetheins und seiner Analogen eignet sich auch ein Verfahren, bei dem nach Verseifung des Produktes die einzelnen Spaltstücke papierchromatographisch nachgewiesen werden. Zu diesem Zwecke wurde eine Probe des kristallisierten S-Benzyl-bisorpantetheins im zugeschmolzenem Reagensglas mit konz. Salzsäure verseift. Das Papierchromatogramm des neutralisierten und weitgehend von Salzen befreiten Reaktionsgemisches zeigte die zu erwartenden Spaltprodukte: β-Alanin, α-Oxy-γ-butyrolakton und S-Benzyl-cysteamin.

^{†)} auf SS 2043b, Alkohol : Ammoniak : Wasser = 80 : 4 : 16.

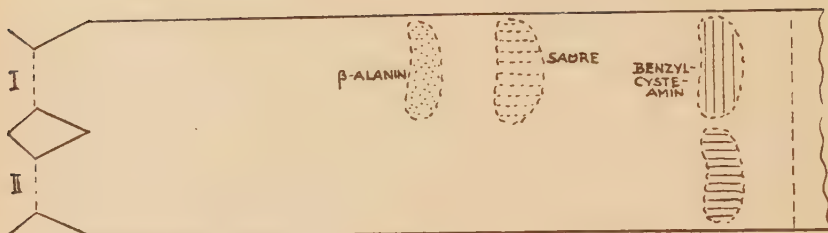


Bild 5. Chromatogramm von S-Benzyl-bisnorpentethein

I verseift mit konz. HCl

II unverseift

auf SS 2043b, Alkohol : Ammoniak : Wasser = 80 : 4 : 16.

S-Benzylcysteamin und β -Alanin wurden mit Ninhydrin als Sprühreagens, die Säure durch Besprühen des Streifens mit Methylrot nachgewiesen.

Zur weiteren Identifizierung des S-Benzyl-bisnorpentetheins wurde es mit Benzoylchlorid nach Schotten-Baumann in das $O^{2'}$, $O^{4'}$ -Dibenzoat übergeführt, dessen Schmelzpunkt wie das des S-Benzyl-bisnorpentetheins bei $112-114^{\circ}\text{C}$ lag.

3) S-Benzoyl- α -desoxy-pantethein.

Wider Erwarten bereitete die Darstellung des S-Benzoyl- α -desoxy-pantetheins große Schwierigkeiten, was sich wegen der schwereren Zugänglichkeit des zu Grundeliegenden β,β -Dimethyl- γ -butyrolaktons besonders unangenehm auswirkte. Schon bei der Synthese der α -Desoxy-pantothensäure nach Barnett war aufgefallen, dass die Ausbeute recht unbefriedigend blieb (s.S.19). Nach der Williams'schen Vorschrift konnte die α -Desoxy-pantothensäure zwar in guter Ausbeute erhalten werden, doch blieb die weitere Umsetzung zum S-Benzoyl- α -desoxy-pantethein nach Schwyzer auch bei mehrmaliger Wiederholung ohne Erfolg.

Darauf versuchte ich, über die S-Benzylverbindung ans Ziel zu kommen und erhielt das S-Benzyl- α -desoxy-pantethein

nach der beim S-Benzyl-bisnorpantethein beschriebenen Methode (s.S.22) in leidlicher Ausbeute. Das gereinigte Produkt konnte nicht kristallisiert werden, war aber papierchromatographisch einheitlich und wurde durch Verseifung mit konz. Salzsäure und Untersuchung der Verseifungsprodukte identifiziert. S-Benzylcysteamin und β -Alanin wurden chromatographisch, das β,β -Dimethyl- γ -butyrolakton als Hydroxamsäure nachgewiesen.

Bei der anschließenden Reduktion des S-Benzyl- α -desoxypantetheins in flüssigem Ammoniak ließ sich nach der Benzoylierung mit Benzoylchlorid unter Bedingungen, wie sie bei der Darstellung des S-Benzoyl-bisnorpantethein-phosphats beschrieben werden (s.S.30), eine kristallisierte Verbindung fassen. Das in Bild 6 wiedergegebene UV-Spektrum zeigt jedoch, dass es sich nicht um das gewünschte Produkt handelte, sondern vermutlich, wie die Erhöhung

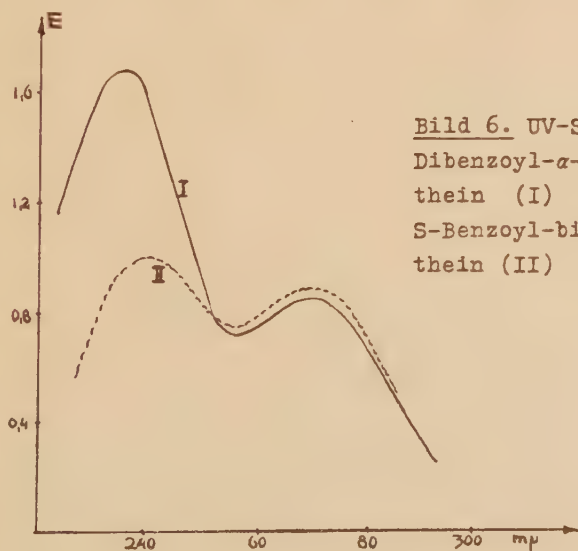
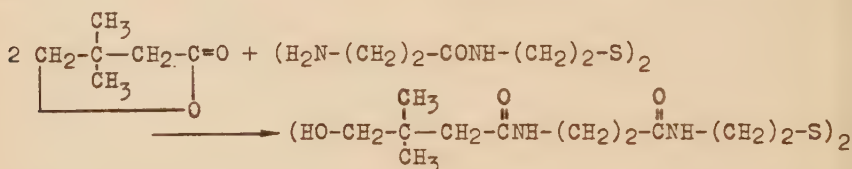


Bild 6. UV-Spektrum S-O^{4'}-
Dibenzoyl- α -desoxypante-
thein (I)
S-Benzoyl-bisnorpante-
thein (II)

des Maximums im kurzwelligen und seine Verschiebung von 241 nach 235 m μ zeigt, um das S-O^{4'}-Dibenzoat des α -Desoxypantetheins.

Eine Acylbestimmung nach K u h n und R o t h bestätigte das. Im Molekül wurden zwei Moleküle Benzoesäure nachgewiesen.

Da die von der α -Desoxypantothensäure ausgehenden Syntheseveruche zu keinem positiven Ergebnis geführt hatten, versuchte ich, das Laktone mit Alethin (N-B-Alanyl-cystamin) umzusetzen:



Durch mehrstündiges Erhitzen von β,β -Dimethyl- γ -butyrolaktone und Alethin auf 100°C erhielt ich α -Desoxypantethin als gelbes Oel in mäßiger Ausbeute. Der R_f -Wert des papierchromatographisch einheitlichen Produktes war mit 0,88 fast gleich dem des Bisnor- α -desoxypantethins mit 0,87.

Durch Reduktion des α -Desoxypantethins mit Natrium-Amalgam und anschließende Benzoylierung des Mercaptans gelangte ich zu einer kleinen Menge S-Benzoyl- α -desoxypantethein, konnte es jedoch bisher nur als gelbes, zähes Oel isolieren. Aus dem Spektrum ließ sich auf einen Reinheitsgrad von 85 % schließen. Die vergleichende Chromatographie auf SS 2043bm mit m/10 sec. Natriumphosphat ergab folgende R_f -Werte:

S-Benzoyl-bisnor- α -desoxypantethein	0,78
S-Benzoyl-bisnor-pantethein	0,80
S-Benzoyl- α -desoxy-pantethein	0,80

Da die bisher beschriebenen Syntheseveruche sehr unbefriedigend ausgefallen waren, wurde die Synthese des α -Desoxypantethins auf dem von W i e l a n d und B o k e l m a n n (64) beschriebenen Wege in Angriff genommen. Das aus α -Desoxypantothensäure mit Chlorkohlensäureester dargestellte gemischte Anhydrid wurde in eine wässrige Lösung von Cystamin getropft. Nach dem Einengen der schwach angesäuerten Lösung wurde der Rückstand, in Äthanol-Essigester gelöst, sauer und

alkalisch gewaschen. Der nach Abziehen des Lösungsmittels verbleibende Rückstand wurde in Wasser aufgenommen, die Disulfidverbindung mit Natrium-Amalgam reduziert und das gebildete Mercaptan benzoyliert. Ich entfernte das überschüssige Benzoylchlorid und extrahierte den Thiolester mit Essigester. Der nach Abziehen des Lösungsmittels verbleibende Rückstand zeigte im UV-Spektrum noch eine Verunreinigung durch Benzoesäure, die sich durch Aufnehmen in Essigester und Fällen des Pantetheinanalogen mit Petroläther weitgehend entfernen ließ.

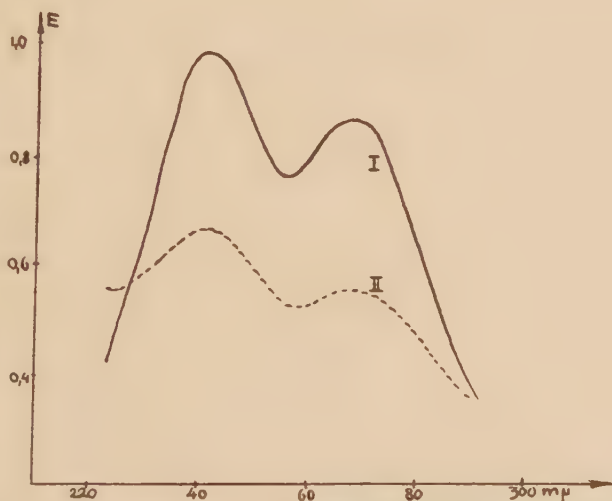


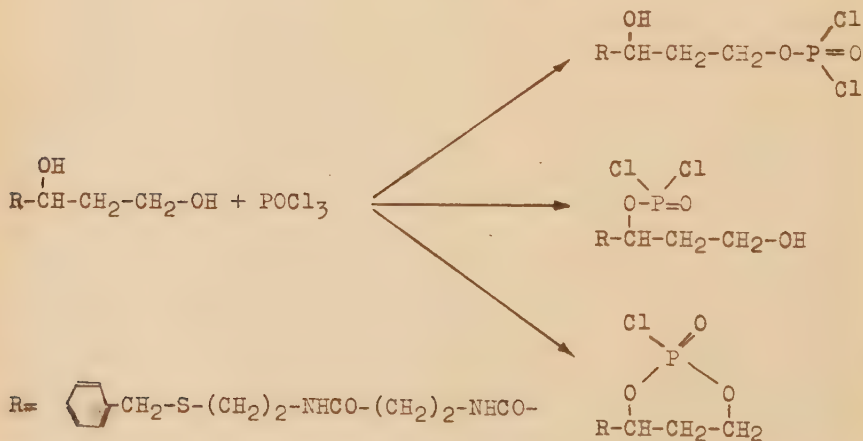
Bild 7. UV-Spektrum: 0,1 $\mu\text{Mol/ml}$; m/10 Phosphatpuffer pH 7
 I S-Benzoyl- α -desoxy-pantethein
 II S-Benzoyl- α -desoxy-pantethein-phosphat

Die Substanz zeigte, mit m/10 sec. Natriumphosphat absteigend chromatographiert, den R_f -Wert 0,78. Zur weiteren Identifizierung wurde eine kleine Probe mit konz. Salzsäure verseift, die entstandene Benzoesäure umkristallisiert und durch Schmelzpunkt charakterisiert. Das Laktone konnte aufgeäthert und nach Überführung in die Hydroxamsäure nachgewiesen werden. β -Alanin und Cysteamin wurden papierchromatographisch mit Ninhydrin als Sprühreagens identifiziert.

Aufbau der phosphorylierten Pantetheinanalogen

Die zur Stufe des Pantethein-4'-phosphats führende Phosphorylierung der Pantetheinanalogen erforderte zwei grundsätzlich verschiedene Methoden.

Bisnor- α -desoxypantethein und α -Desoxypantethein konnten, da sie nur die alkoholische Gruppe in 4'-Stellung enthielten, ohne Bedenken mit einem kräftig phosphorylierenden Agens, etwa mit Phosphoroxychlorid, behandelt werden. Dagegen bestand bei Anwendung des gleichen Verfahrens auf Bisnorpantethein die Gefahr, dass die Phosphorylierung in der 2'- und der 4'-Stellung erfolgte und somit als Reaktionsprodukte ausser dem 4'-Phosphat das 2'-Phosphat, das 2',4'-Diphosphat und das cyclische 2',4'-Phosphat entstehen könnten:



Um diese Komplikation zu vermeiden, hatte ich bei der Synthese der Bisnorpantothensäure versucht, die 2'-OH-Gruppe zu schützen (s.S.12). Da dieses nicht gelungen war, musste versucht werden, eine selektive Phosphorylierung durchzuführen, die ausschließlich an der 4'-OH-Gruppe erfolgte. Dafür schien als phosphorylierendes Agens das Dibenzyl-phosphoroxychlorid geeignet, das B a d d i l e y (48) zur selektiven Phosphorylierung des Pantetheins benützt hatte.

Das aus Dibenzyl-phosphit durch Oxydation mit Chlor erhaltene Dibenzyl-phosphoroxychlorid (65):



greift, wenn es in stöchiometrischer Menge angewendet wird, ganz bevorzugt eine primäre OH-Gruppe, im Falle des Bisnor-pantetheins also die 4'-OH-Gruppe an und lässt die sekundäre 2'-OH-Gruppe unberührt. Die Umsetzung wird nach B a d - d i l e y in trockenem Tetrachlorkohlenstoff bei tiefen Temperaturen durchgeführt und verläuft mit guter Ausbeute.

1) S-Benzoyl-bisnor- α -desoxypantethein-4'-phosphat

In einer Reihe von Versuchen erwies sich eine Phosphorylierung des S-Benzoyl-bisnor- α -desoxypantetheins als günstig, bei der das in Chloroform emulgierte, kristallisierte Produkt in eine Lösung von Phosphoroxychlorid in trockenem Pyridin eingebracht wurde (66). Ein kräftiger, durch die Lösung geblasener Stickstoffstrom erzielte einerseits eine gute Durchmischung, andererseits schloss er den Zutritt von Feuchtigkeit aus. Nach Entfernung des Pyridins durch Amberlite IR 120 (Kationenaustauscher), wurde zur Spaltung von gebildetem S-Benzoyl-bisnor- α -desoxypantethein-4'-pyrophosphat (66)(67) mit Perchlorsäure verseift. Die Perchlorsäure konnte als Kaliumsalz gefällt und das Esterphosphat nach Einengen der Lösung im Vakuum mit Phenol (68) aus der sauren Phase geschüttelt werden. Beim Behandeln des mit Chloroform verdünnten Phenolextraktes mit Bicarbonatlösung ging S-Benzoyl-bisnor- α -desoxypantethein-4'-phosphat in die wässrige Phase und konnte daraus nach Abtrennung der Natriumionen mittels Amberlite IR 120 durch Gefriertrocknung in 40 - 56 %iger Ausbeute erhalten werden.

Obwohl es nach vielen, erfolglosen Versuchen schließlich gelang, das anfangs zäh-ölige Produkt aus Methanol-Äther zu kristallisieren (Smp. 118-119°C), war es nicht möglich, eine geringe Verunreinigung von S-Benzoyl-bisnor- α -desoxypantethein-4'-pyrophosphat vollständig abzutrennen. Chromatographisch war die Substanz einheitlich⁺; im Elektropherogramm zeigte sich jedoch noch eine schwache zweite Bande, die auf das Esterpyrophosphat zurückzuführen war.

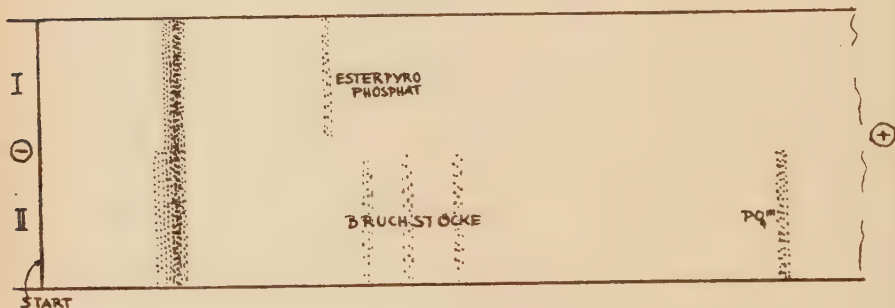


Bild 8. Elektropherogramm von

- I S-Benzoyl-bisnor- α -desoxypantethein-4'-phosphat
- II S-Benzoyl-bisnorpantethein-4'-phosphat

Puffer: Pyridinacetat pH 6,8; Laufzeit: 40 Min.
Feldstärke: 50 Volt/cm.

Dass es sich bei dem isolierten Produkt um das gewünschte S-Benzoyl-bisnor- α -desoxypantethein-4'-phosphat handelte, konnte durch Analyse gezeigt werden. Das Verhältnis Phosphat zu Thiolester war nach Phosphatanalyse und UV-Spektrum 1 : 1. Das UV-Spektrum zeigte die für S-Benzoylverbindungen charakteristischen Extinktionsmaxima bei 241 und 268 m μ mit den ϵ -Werten 9800 und 9000 (s. Bild 3, S.21).

2) S-Benzoyl-bisnorpantethein-4'-phosphat.

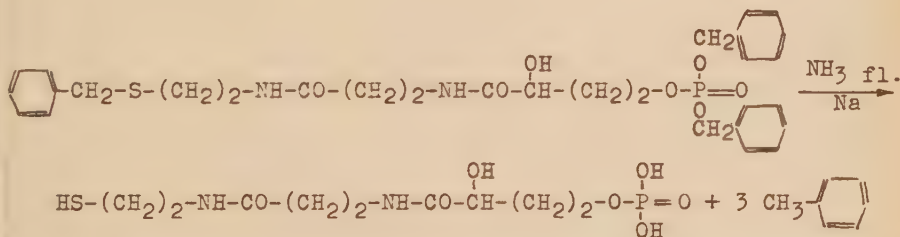
Wie schon in der Einleitung zu diesem Kapitel gesagt, musste im Falle des S-Benzoyl-bisnorpantetheins die Phosphorylierung mit Dibenzyl-phosphoroxychlorid in Anlehnung an die Vor-

⁺) Rf-Wert 0,64; Butanol : Eisessig : Wasser = 50 : 20 : 30;
SS 2043b

schrift von B a d d i l e y (48) gewählt werden.

Kristallisiertes S-Benzyl-bisnorpantethein wurde in trockenem Pyridin gelöst, gekühlt und mit einer Lösung der äquimolaren Menge Dibenzyl-phosphoroxychlorid in absolutem Tetrachlorkohlenstoff versetzt. Die gelbe Lösung hielt ich einige Zeit bei -40°C und dann noch mehrere Stunden bei Zimmertemperatur. Die Aufarbeitung des Reaktionsansatzes lieferte ein öliges, bräunlich gefärbtes Produkt, dessen Rf-Wert bei der Papierchromatographie in Alkohol : Wasser : Ammoniak (80 : 16 : 4) bei 0,73 lag. Zwei weitere Flecken, deren einer (Rf-Wert 0,48) nur Phosphat und deren anderer (Rf-Wert 0,86) nur Schwefel enthielt, waren nicht umgesetzte Reste der Ausgangsmaterialien.

Benzyläther und -ester lassen sich in flüssigem Ammoniak mit metallischem Natrium reduzierend spalten. Die Anwendung dieser Methode auf das erhaltene S-Benzyl-bisnorpantethein-4'-dibenzylphosphat führte zum Bisnorpantethein-4'-phosphat:



Durch anschließende Veresterung der freien SH-Gruppe mit Benzoylchlorid war das gewünschte S-Benzoylderivat zugänglich.



Das auf diesem Wege durch Gefriertrocknung erhaltene schwach gelb gefärbte Produkt zeigte im Elektropherogramm nur geringe Verunreinigungen an freiem Phosphat und phos-

phorylierten Bruchstücken des Bisnor-pantetheinphosphats, die in flüssigem Ammoniak entstanden waren (s.Bild 8, II, S.30). Aus dem UV-Spektrum ließ sich auf ca. 90 %ige Reinheit schließen. Die Absorptionskurve war typisch für einen Thioester der Benzoesäure (s.Bild 4, S.22). Der Rf-Wert der Substanz mit 0,65 stimmte genau mit dem des S-Benzoylpantethein-4'-phosphats überein und war nur unwesentlich größer, als der des S-Benzoyl-bisnor- α -desoxy-pantethein-4'-phosphats mit 0,64⁺).

3) S-Benzoyl- α -desoxy-pantethein-4'-phosphat.

Die Umsetzung des S-Benzoyl- α -desoxy-pantetheins mit Phosphoroxychlorid und die Aufarbeitung und Reinigung des erhaltenen Phosphats erfolgte genau nach der auf Seite 29 beim S-Benzoyl-bisnor- α -desoxy-pantethein-4'-phosphat beschriebenen Weise und führte mit 41 % Ausbeute zu dem gewünschten Produkt.

Wie die Phosphatanalyse ergab, enthielt das S-Benzoyl- α -desoxy-pantethein-4'-phosphat nur eine geringe Menge labiles Phosphat. Nicht so befriedigend war die UV-Analyse (s.Bild 7, S.27). Die Absorptionsmaxima waren erniedrigt und entsprachen einem Reinheitsgrad von ungefähr 65 %. Wie sich mit sodaalkalischer Nitroprussidnatriumlösung nachweisen ließ (69), bestand die Verunreinigung vor allem aus α -Desoxy-pantethein-4'-phosphat, das durch partielle Hydrolyse des Thioesters entstanden war.

Im Papierchromatogramm wanderte S-Benzoyl- α -desoxy-pantethein-4'-phosphat (Rf-Wert 0,61) kaum weiter als S-Benzoyl-bisnor- α -desoxy-pantethein-4'-phosphat (Rf-Wert 0,59) oder S-Benzoyl-bisnor-pantethein-4'-phosphat (Rf-Wert 0,60). Daneben fand sich noch ein zweiter, wesentlich schwächerer Fleck mit Rf-Wert 0,78 auf dem Chromatogramm, dessen Natur nicht festgestellt wurde. (Butanol : Eisessig : Wasser = 50 : 20 : 30, SS 2043bm. Wegen Verwendung einer anderen Papiersorte, SS 2043bm statt SS 2043b, unterscheiden sich die Rf-Werte etwas von den bisher erhaltenen Werten.)

⁺) Butanol : Eisessig : Wasser = 50 : 20 : 30, SS 2043b.

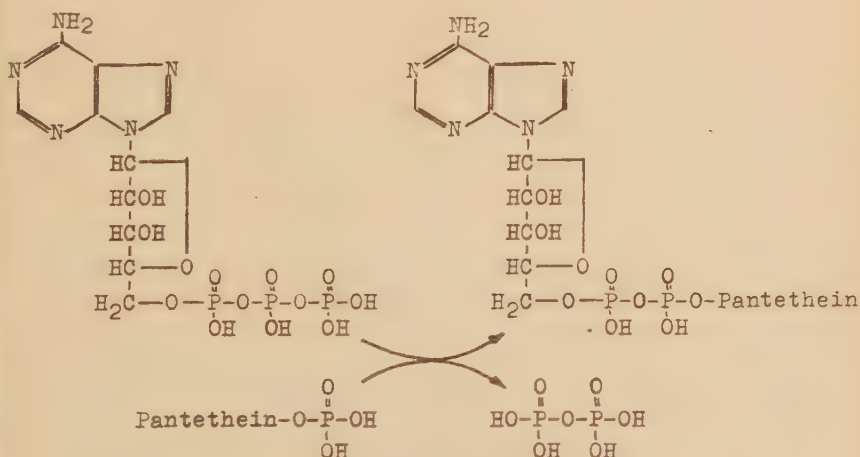
Aufbau zur Stufe des Dephospho-CoA

In den letzten Jahren konnten Novelli et al. (70) (71) die enzymatische Synthese des Coenzym-A aus Pantethein bzw. Pantetheinphosphat aufklären und folgende Reaktionsschritte sicher stellen:

- I Pantethein + ATP $\longrightarrow$ Pantethein-4'-phosphat + ADP
- II Pantethein-4'-phosphat + ATP $\longrightarrow$ Dephospho-CoA + Pyrophosphat
- III Dephospho-CoA + ATP $\longrightarrow$ Coenzym-A + ADP



Während die Reaktionen I und III zu den seit langen bekannten biologischen Phosphorylierungen zu zählen sind, die durch Kinasen katalysiert werden, verläuft Reaktion II völlig anders. Hier wird die Adenylsäure aus dem ATP auf das Pantetheinphosphat übertragen:



Analoge Reaktionen, die Biosynthese des DPN aus NMN und ATP und die Biosynthese des FAD aus FMN und ATP hatte

K o r n b e r g (72) schon früher untersucht und das diese Reaktionen katalysierende Ferment aus Kartoffeln isoliert.

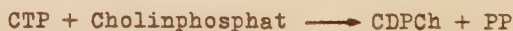


Für diese Fermente wurde der Name Adenyltransferasen vorgeschlagen (73).

1953 fanden M u n c h - P e t e r s o n et al. (74) ein weiteres Ferment dieser Reihe, die Uridindiphosphatglucose-pyrophosphorylase, das die im Glucose-Galaktose-Stoffwechsel ablaufende Reaktion:



katalysiert. Schließlich konnten 1956 K e n n e d y und W e i s s (75) das Ferment Cytidyldiphosphatcholin-pyrophosphorylase nachweisen, das bei der Biosynthese des Lecithins eine Rolle spielt, in dem es die Bildung des Cytidyldiphosphacholins aus CTP und Cholinphosphat katalysiert:

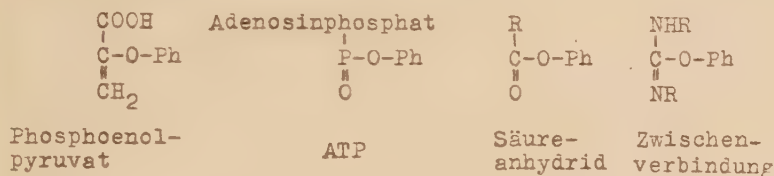


Bei der chemischen Synthese von Dephospho-CoA-analogen war es naheliegend, das ATP durch Adenylsäure (AMP) zu ersetzen und die Pyrophosphatbindung durch ein wasserabspaltendes Mittel zu bilden.

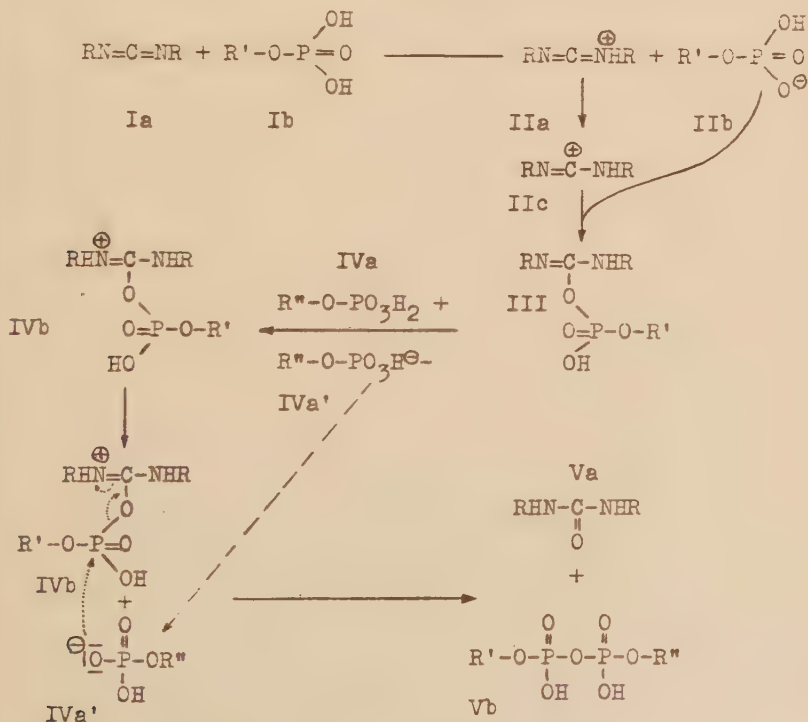
K h o r a n a (76) und T o d d (77) hatten Carbodiimide bei der Synthese von Pyrophosphatbrücken eingeführt und damit gute Erfahrungen gemacht.

Für die Reaktion wird folgender Mechanismus angenommen: Zunächst wird ein Proton an das freie Elektronenpaar eines Carbodiimid-Stickstoffs angelagert (s.S.35,IIa). In die im Zuge einer Elektronenverschiebung entstehende Elektronenlücke des Carboniumions (IIc) lagert sich das Sauerstoffelektronenpaar des Phosphats (IIb) unter Bildung der Zwischenverbindung (III) ein. Diese enthält nun eine energiereiche Bindung, die ja - wie ein Vergleich mit dem Phospho-

enolpyruvat, dem ATP oder einem Säureanhydrid zeigt, eine diesem analoge Struktur besitzt.



Die weitere Reaktion, nämlich die Übertragung des energie-
reichen Phosphats auf das zweite Phosphat (IVa') kann man
der Übertragung von AMP aus dem ATP auf Pantetheinphosphat
gleichsetzen (s. Gleichung II, S. 33); genau wie dort wird
die Energie aus der Bindung des Zwischenkörpers (IVb) in
die Energie der Pyrophosphatbindung (Vb) übertragen.



Dabei ist von großem Vorteil, dass die Reaktion bei Zimmertemperatur und in Pyridin als Lösungsmittel abläuft. Wichtig ist, dass bereits zu Beginn der Reaktion Wasser vorhanden ist. Selbstverständlich muss darum ein enormer Überschuss an Carbodiimid eingesetzt werden, da die gewünschte Reaktion nur noch eine Konkurrenzreaktion bezüglich der Wasseranlagerung ist.

K h o r a n a (67) und T o d d (78) sowie K h o r a n a , D e k k e r und H a l l (79)(80)(81) bauten auf diese Weise ADP, ATP, GDP, GTP und Diadenosinpyrophosphat (DAPP) auf. Bei der Synthese von ADP und ATP aus AMP und Orthophosphat und der Synthese von GDP und GTP aus GMP und Orthophosphat setzten die Autoren das Orthophosphat in großem Überschuss ein.

1954 gelang es K e n n e r und T o d d (82) die Uridindiphosphatglucose aus Glucose-1-phosphat und UMP mittels Carbodiimiden zu synthetisieren, während H u e n n e k e n s und K i l g o u r (83) 1955 das FAD aus AMP und PMN nach dieser Methode aufbauten. In jüngster Zeit sind Arbeiten von K e n n e d y und W e i s s (84) erschienen, in denen von der Synthese des Cytidyldiphosphatcholins aus CMP und Cholinphosphat berichtet wird.

In Analogie zu diesen Synthesen sollten Dephospho-CoA bzw. seine Analogen, durch Zusammenfügen von Analogen des Pantethein-4'-phosphats mit Adenosin-5'-phosphat mittels Carbodiimid aufgebaut werden.

Bei der von mir in diesem Sinne geplanten Synthese hatte ich mit der Bildung verschiedener Pyrophosphate zu rechnen: Diadenosinpyrophosphat, den Analogen des Dipantethein-4'-pyrophosphats und den gewünschten Analogen des Dephospho-CoA. Als Verhältnis von AMP zu Analogen des Pantetheinphosphats wählte ich zwei zu eins und mischte die Substanzen mit Carbodiimid in Pyridin, das etwa 8 bis 10 % Wasser enthielt, durch mehrstündiges Behandeln mit dem Vibromischer bei Zimmertemperatur.

1) S-Benzoyl-bisnor- α -desoxy-dephospho-CoA.

Ich setzte kristallisiertes S-Benzoyl-bisnor- α -desoxy-pantethein-4'-phosphat und kristallisiertes AMP um. Nach 4 Stunden - bereits nach etwa 1/2 Stunde begann der gebildete Dicyclohexylharnstoff zu kristallisieren - wurden nochmals etwas Wasser und Carbodiimid zugesetzt. Nach abermaligen 4-stündigem Mischen beendete ich die Reaktion durch Zusatz von Wasser.

Um schnell etwas über die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches zu erfahren, bediente ich mich wieder der Papierchromatographie. Nach Entfernung des Pyridins und des Dicyclohexylharnstoffs sowie des nicht umgesetzten Carbodiimids durch mehrstündige Perforation mit Äther wurde eine Probe in Butanol/Eisessig/Wasser absteigend chromatographiert. Das Ergebnis zeigt das folgende Bild:

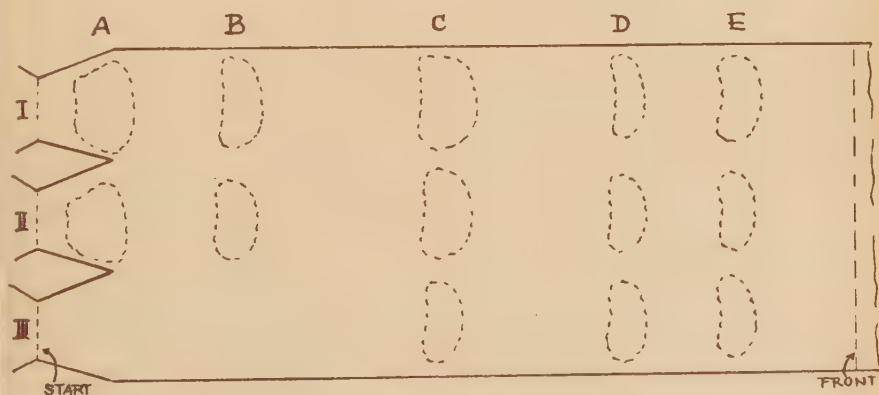


Bild 9. Chromatogramm, absteigend, Butanol : Eisessig : Wasser = 50 : 20 : 30 auf SS 2043b

- I UV-Absorption im durchscheinenden Licht
- II Phosphat, entwickelt nach Cramer
- III Thioester, entwickelt nach Lynen

Hier sind übereinander die Ansicht im UV-Licht, wo die absorbierenden Substanzen zur Absorptionslöschung der Fluoreszenz führen, die Ansicht nach Sichtbarmachung der Phos-

phorsäureverbindungen gemäß der Vorschrift von C r a m e r (85), bzw. der Thiolester mittels des verzögerten Nitroprussidtestes nach L y n e n (63) zu sehen. Aus diesem Ergebnis lässt sich bereits der Schluss ziehen, dass die Substanzen A und B wahrscheinlich schwefelfrei sind, aber Adenin enthalten, in C, D und E dagegen die gewünschten Verbindungen vorliegen könnten.

Um das zu entscheiden, wurden die Substanzen mit neutralem Phosphatpuffer eluiert und die UV-Spektren im Spektralphotometer ausgemessen. Die Spektren der Ausgangsmaterialien, S-Benzoyl- α -desoxy-bisnorpentethein-4'-phosphat und Adenylsäure sind in Bild 10, Kurve I und II gezeigt. Bei Flecken, deren UV-Absorption mit einem dieser beiden Spektren übereinstimmte, konnte es sich folglich nur um nicht umgesetzte Ausgangsprodukte oder um deren symmetrische Pyrophosphate handeln. Im Spektrum der gewünschten Verbindung, die beide chromophore Gruppen enthält, mussten sich Adenin- und Thioesterabsorption überlagern, wie es in Bild 10, Kurve III gezeigt ist.

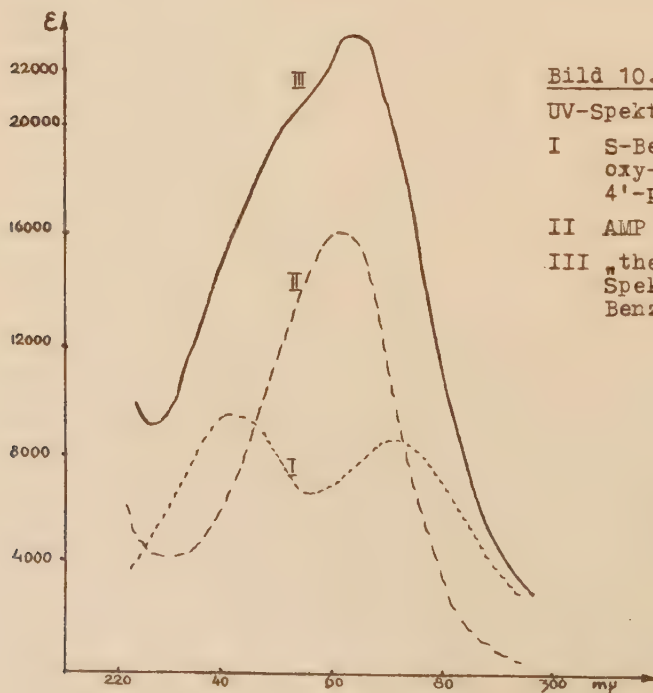


Bild 10.

UV-Spektren

I S-Benzoyl- α -desoxy-pantethein-4'-phosphat

II AMP

III „theoretisches“ Spektrum des S-Benzoyl-CoA

Die Flecken A (Rf-Wert 0,09) und B (Rf-Wert 0,25) konnten nach Spektrum und Rf-Wert als Diadenosinpyrophosphat und AMP identifiziert werden. Beide zeigten das typische Adeninspektrum mit dem stark ausgeprägten Maximum bei 260 mp (s.Bild 11a). Dass Diadenosinpyrophosphat beim Behandeln von AMP mit Dicyclohexylcarbodiimid entsteht, haben bereits T o d d und K e n n e r (77) beschrieben. Die Flecken D und E mit den Rf-Werten 0,76 und 0,86 zeigten das typische Spektrum des S-Benzoylpantetheins (s.Bild 11a). Bei diesen Substanzen handelte es sich folglich um S-Benzoyl-bisnor- α -desoxypantethein-4'-phosphat und um sein Dimeres.

Das Spektrum des mittleren Fleckens (C, Rf-Wert 0,50) war von denen der anderen Substanzen deutlich unterschieden. Es konnte mit dem „theoretischen“ Spektrum⁺ des S-Benzoyl-dephospho-CoA fast genau zur Deckung gebracht werden, wie Bild 11b zeigt.

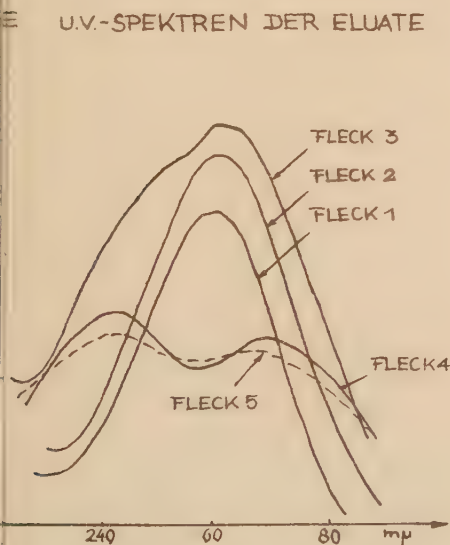


Bild 11a

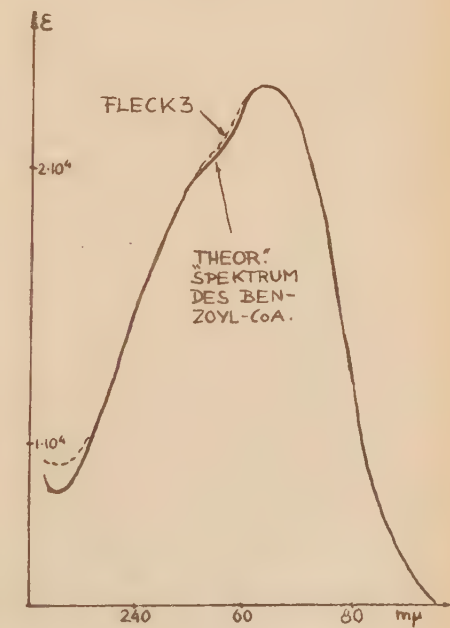


Bild 11b

⁺) Dieses „theoretische Spektrum“ wurde durch Addition der Spektren von AMP und S-Benzoyl-bisnor- α -desoxypantethein-4'-phosphat erhalten (s.Bild 10, Kurve III, S.38).

Daher war anzunehmen, dass in diesem Flecken das gewünschte Analoge des Dephospho-CoA vorlag.

Die nächste Aufgabe bestand nun darin, das gesuchte Produkt aus dem Reaktionsgemisch, in dem es neben den Ausgangsstoffen, AMP und Bisnor- α -desoxypantethein-4'-phosphat sowie deren sich von Pyrophosphorsäure ableitenden Dimeren begleitet war, in präparativem Maßstabe zu isolieren. Hier bot sich als Methode der Wahl die Chromatographie an Dowex 2 an.

Die Methoden der Austauscherchromatographie sind mehrfach beschrieben (86) und wurden von C o h n und V o l k i n bei der Trennung der Komponenten der Nucleinsäuren (87) und der Desoxyribonucleinsäuren (88) angewendet. Auf diese Weise konnten L y n e n und L e r c h (68) auch Dephospho-CoA und Co-A trennen.

Für die Trennung der Reaktionsprodukte bediente ich mich eines Anionenaustauschers (Dowex 2, Formiatform), auf den ich die ausgeätherte, wässrige Lösung der Reaktionsprodukte brachte. Dann wurde mit zunehmender Konzentration an Ameisensäure, später unter Zusatz von Ammonformiat eluiert und die Extinktion des Eluats bei 260 mp gemessen.

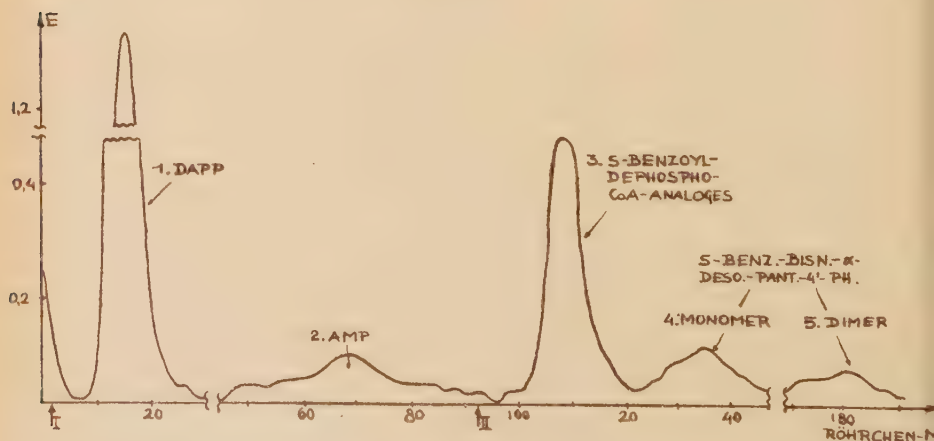


Bild 12. UV-Absorption des Dowex-Eluats. Mischvolumen: 170 ml
 Röhrchenvolumen: 6,3 ml.
 I. 4m HCOOH, II 4m HCOOH + 0,6m HCOONH₄.

Erwartungsgemäß erschienen zuerst die basischen Bestandteile, DAMP und AMP, dann das Dephospho-CoA-analoge und zuletzt S-Benzoyl-bisnor- α -desoxypanthetoin-4'-phosphat und sein Dimeres.

Zur Unterscheidung der Substanzen aus Fraktion 4 und 5 bediente ich mich, da ihre Identifizierung mittels der UV-Analyse nicht möglich war, der vergleichenden Papierchromatographie. Der Rf-Wert einer Probe aus Fraktion 4 war 0,67, der des daneben aufgetragenen S-Benzoyl-bisnor- α -desoxypanthetoin-4'-phosphats 0,64, der einer Probe aus Fraktion 5 0,82 ⁺⁾ . Folglich handelte es sich bei Fraktion 4 um das Monomere, bei Fraktion 5 um das Dimere des Panthetoin-phosphat-analogen.

Wie in Bild 12 (s.S.40) zu sehen ist, konnten die beiden ersten Substanzen mit verdünnter Ameisensäure eluiert werden. Für die Fraktionen 3,4 und 5 war dagegen Ammonformiat nötig, wobei das gesuchte S-Benzoyl-bisnor- α -desoxydephospho-CoA regelmäßig sofort nach Zusatz des Ammonformiates erschien. Es war jedoch nicht möglich, durch sehr hohe Ameisensäurekonzentration den Zusatz von Ammonformiat zu umgehen.

Die Isolierung der Substanzen aus den Eluatien geschah auf verschiedenen Wegen. Fraktion 1 und 2, die frei von Ammonformiat waren, konnten unmittelbar gefriergetrocknet werden. Die Fraktionen 3,4 und 5 wurden nach Zusatz von Schwefelsäure mit Phenol extrahiert (68) und die in die organische Phase übergegangenen Esterphosphate nach Überführung in die Natriumsalze mittels Extraktion mit Natriumbicarbonatlösung, Filtration über Amberlite IR 120 und Gefriertrocknung abgeschieden. Die dabei erhaltenen Präparate waren nach den UV-Spektren rein (s.Bild 13, S.42). Ein Papierelektropherogramm, das die Einheitlichkeit der Substanz aus Fraktion 3 zeigt, ist in Bild 14 (S.42) wiedergegeben.

⁺⁾ Butanol : Eisessig : Wasser = 50 : 20 : 30, auf SS 2043b absteigend.

Wie die analytischen Bestimmungen des Produktes aus Fraktion 3, einem sehr zähen, gelbbraunen Oel, ergaben, verhielten sich Phosphat zu Thioester wie 2 : 1.

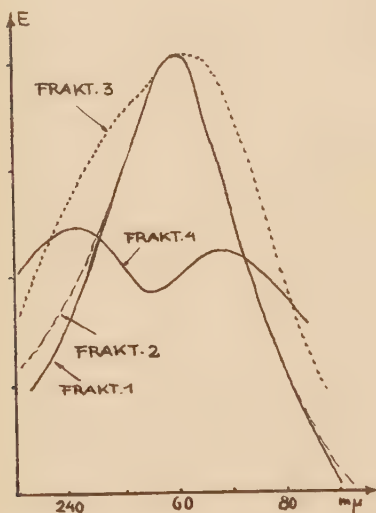


Bild 13. UV-Spektren der Eluate, in m/10 Phosphatpuffer pH 7.

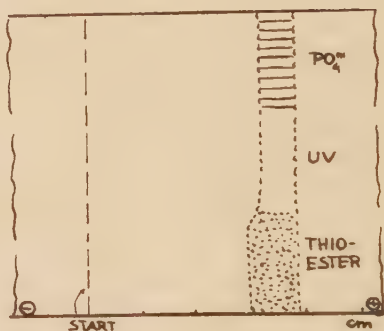
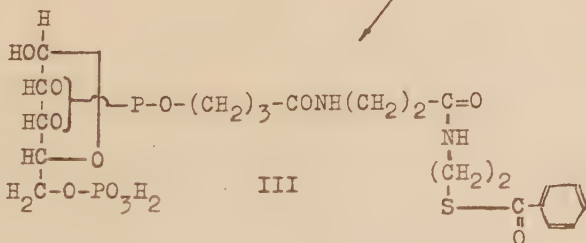
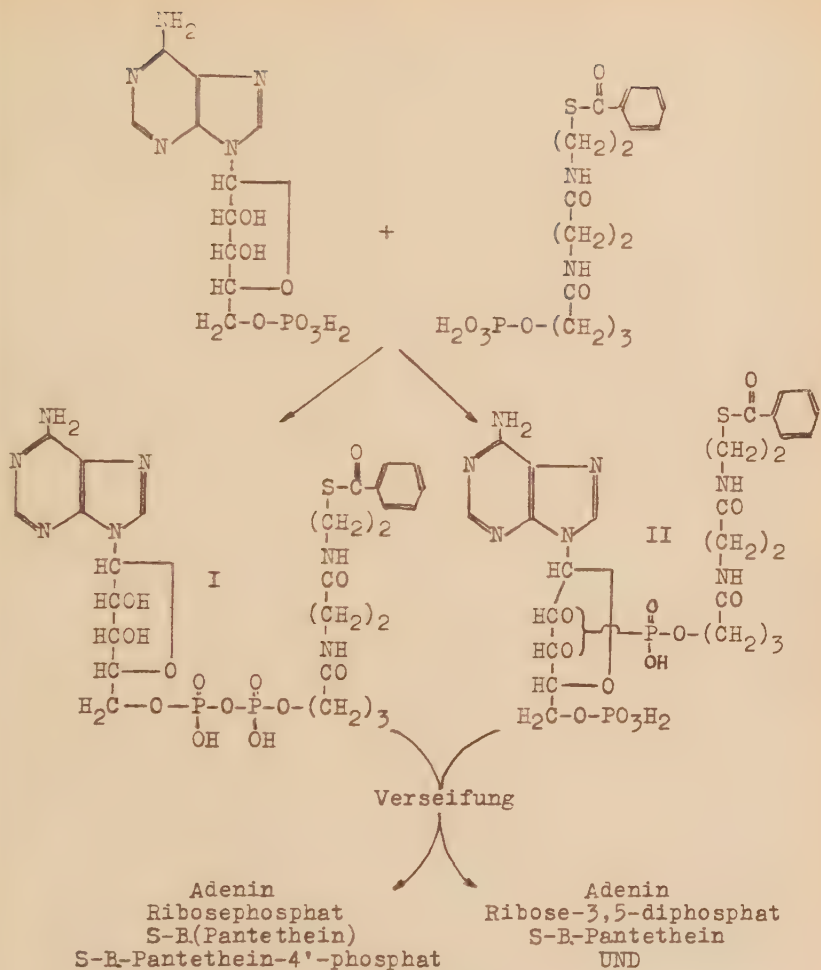


Bild 14. Elektropherogramm des S-Benzoyl-bisnor- α -desoxy-dephospho-CoA; Pyridin-acetat pH 6,4; $t = 45$ Min. 35 V/cm.

Es galt nun noch zu beweisen, dass 1 Mol AMP mit 1 Mol S-Benzoyl-bisnor- α -desoxypantethein-4'-phosphat unter Bildung der Pyrophosphatbrücke reagiert hatten und nicht eine Umsetzung zwischen dem Phosphatrest des Pantetheinphosphat-analogen und der Hydroxylgruppe in 2'- oder 3'-Stellung des AMP eingetreten war.

Die Entscheidung, welche der beiden Reaktionen abgelaufen war, war auf verschiedenen Wegen möglich.

Beim 7 Minuten langen Kochen mit n-Säure wird die Pyrophosphatbindung vollständig hydrolysiert, während die gewöhnliche Esterbindung erhalten bleibt. Die beiden möglichen Verbindungen mussten bei dieser Behandlung unterschiedliche Verseifungsprodukte liefern, wie das folgende Schema zeigt.



Aus der Verbindung I entstandene Verseifungsprodukte mussten sich vom AMP bzw. S-Benzoyl-bisnor- α -desoxypantethein-4'-phosphat ableiten. Dagegen war aus der Verseifung des Produktes II ein mit Ribose in 2- oder 3-Stellung verestertes S-Benzoyl-bisnor- α -desoxypantethein-4'-phosphat der Struktur III zu erwarten, das sich papierchromatographisch feststellen lassen müsste.

Um den Versuch auszuführen, wurden Adenosin, AMP, S-Benzoyl-bisnor- α -desoxypantethein-4'-phosphat und das synthetisierte Produkt 8 Minuten mit 1N-Salzsäure bei 100°C behandelt und Proben der Verseifungsansätze neben Adenosin, AMP und S-Benzoyl-bisnor- α -desoxypantethein-4'-phosphat absteigend chromatographiert. Nach Lokalisierung der UV-absorbierenden Substanzflecken entwickelte ich das Chromatogramm auf Thioester und Phosphat. Wie Bild 15 zeigt, fanden sich unter den Hydrolyseprodukten der synthetisierten Verbindungen nur Flecken, die auch bei Verseifung von Adenosin, AMP und dem Analogon des Pantetheinphosphats auftraten.

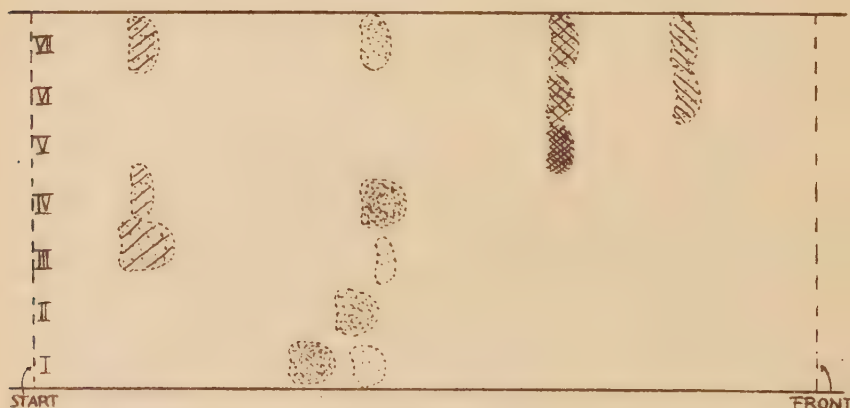


Bild 15. Chromatogramm der Verseifungsprodukte auf SS 2043b, Butanol : Eisessig : Wasser = 50 : 20 : 30, absteigend. ● = UV-Absorption, ⊘ = Thioester, ⊙ = Phosphat. I = Adenosin, II = Adenosin (verseift), III = AMP, IV = AMP (verseift), V = A-Benzoyl-bisnor- α -desoxypantethein-4'-phosphat, VI = dasselbe verseift, VII = S-Benzoyl-bisnor- α -desoxy-dephospho-CoA (verseift).

Dieses Ergebnis konnte mit der von Buchanan, Decker und Long (89) beschriebenen Methode, dem Nachweis freier 1,2-Diole erhärtet werden. Freie 1,2-Diole ergeben bei der Oxydation mit Perjodat und anschließender Behandlung mit Schwefeldioxyd und Rosanilin eine intensive Blaufärbung, während Diole, bei denen eine oder beide OH-Gruppen substituiert sind, keine Reaktion zeigen.



Nebeneinander wurden AMP, S-Benzoyl-bisnor- α -desoxydephospho-CoA und Coenzym-A auf Papier aufgetragen und - wie im Experimentellen Teil beschrieben - behandelt. Während AMP und S-Benzoyl-bisnor- α -desoxydephospho-CoA tiefblau-violette Flecken ergaben, blieb die mit Coenzym-A besetzte Stelle farblos.

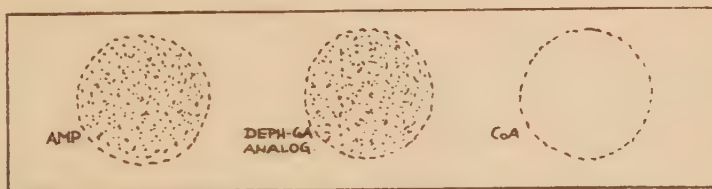
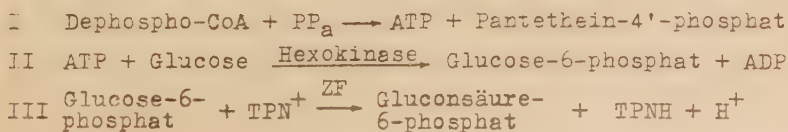


Bild 16. Farbreaktion nach Buchanan et al. auf 1,2-Diole.

Nachdem durch diese Versuche dargetan war, dass in dem synthetischen Produkt ein Analoges des Dephospho-CoA vorlag, prüfte ich als nächstes, ob dieses gegenüber Dephospho-CoA veränderte Molekül von Dephospho-CoA-pyrophosphorylase gespalten würde. Das Ferment katalysiert folgende Reaktion (I):



Ich konnte also bei Inkubation des Produktes mit anorganischem Pyrophosphat und Enzym die Bildung von S-Benzoyl-bisnor- α -desoxy-pantethein-4'-phosphat und ATP erwarten. Um den Ablauf der Reaktion zu messen, koppelte ich die Spaltung des Dephospho-CoA-analogen mit der Hexokinase-reaktion (II). Unter diesen Bedingungen wird das bei der Spaltung in Reaktion (I) gebildete ATP als Glucose-6-phosphat abgefangen, das sich mit Hilfe des Warburg'schen Zwischenfermentes (Glucose-6-phosphat-dehydrogenase) bestimmen lässt. Dieses Ferment katalysiert die Wasserstoffabspaltung von Glucose-6-phosphat unter Bildung von TPNH (III), das optisch bei 366 m μ gemessen wird.

Das Dephospho-CoA-analoge wurde in Gegenwart von Fluorid, um die Pyrophosphatase zu hemmen, mit Pyrophosphat, Glucose und den Fermenten Dephospho-CoA-pyrophosphorylase und Hexokinase inkubiert. Von Zeit zu Zeit wurden kleine Proben entnommen und das gebildete Glucose-6-phosphat mittels Zwischenferment und TPN bestimmt. Abbildung 17 zeigt das Ergebnis eines derartigen Versuches.

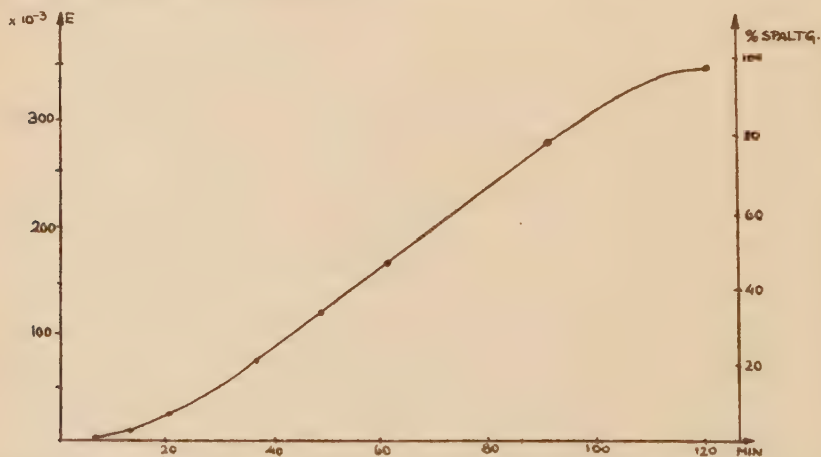
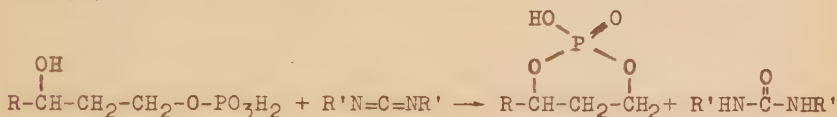


Bild 17. Messung der Spaltung des Dephospho-CoA-analogen. Testansatz (in ml): m/10 Trispuffer pH 8,1 (1,0); m/10 MgCl₂ (0,02); m/10 Pyrophosphat (0,07); m/10 Cyst.HCl (0,1); m/10 F' (0,01); m-Glucose (0,05); Ferment (3 mg Prot.); 2 μ M Deph.-CoA-anal.; Hexokin. (15 γ Prot.). Wasser ad 2 ml. Nach x Min. je 0,2 ml entnommen. Dazu: m/10 Trispuffer pH 8,1 (1,74); Zw.-Ferment (1 mg Prot.); Start mit 0,3 μ M TPN; Ges.-Vol. = 1,8 ml. λ = 366 m μ ; d = 1 cm; T = 35°C.

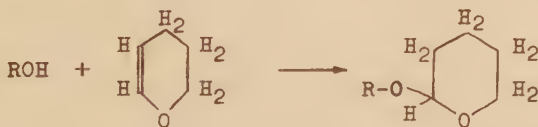
Nach 2 Stunden, als die Reaktion praktisch stehen blieb, wurde das bei 100 %iger Spaltung des S-Benzoyl-bisnor- α -desoxydephospho-CoA gemäß Gleichung I - III (s.S.45) zu erwartende TPNH gebildet.

2) S-Benzoyl-bisnor-dephospho-CoA.

Während bei der Umsetzung von AMP mit S-Benzoyl-bisnor- α -desoxyantethin-4'-phosphat nur die Möglichkeit zur Bildung einer Pyrophosphatbrücke bestand - dass keine Veresterung der 2'- und 3'-OH-Gruppe der Adenylsäure erfolgte, wurde eben gezeigt - war die Umsetzung von AMP mit S-Benzoyl-bisnorantethin-4'-phosphat nicht ohne weiteres möglich. Unter der Wirkung des wasserabspaltenden Carbodiimids könnte ein cyclischer Phosphorsäureester gebildet werden:



Diese Reaktion ist nach K h o r a n a (76) möglich. Deshalb war es, um diese Nebenreaktion auszuschließen, notwendig, die α -OH-Gruppe vorübergehend zu schützen, was durch Bildung eines Acetals mit Dihydropyran bewirkt werden konnte. Ganz allgemein lassen sich nach W o o d s und K r a m e r (90) Alkohole unter der katalytischen Einwirkung von trockenem Chlorwasserstoff mit Dihydropyran umsetzen:



S c h w y z e r et al. (91) hatten zur Veresterung von Aminosäuren von dieser Möglichkeit Gebrauch gemacht.

Die bei vielen Acetalen mögliche Isolierung durch Ätherextraktion des mit Alkali versetzten Reaktionsgemisches

war beim Acetal des Bisorpantethein-4'-phosphats nicht anwendbar. Einerseits wird die Thioesterbindung des vorliegenden S-Benzoylderivats durch Alkali gespalten, andererseits ist das Produkt nicht ätherlöslich.

Ich überzeugte mich daher wiederum mit Hilfe der Papierchromatographie vom Ablauf der gewünschten Umsetzung. Das Reaktionsgemisch, das beim Einleiten von Chlorwasserstoff in die Lösung von S-Benzoyl-bisorpantethein-4'-phosphat und Dihydropyran in Chloroform erhalten wurde, zeigte bei der papierchromatographischen Analyse nur einen Thioester mit dem Rf-Wert 0,31; der Rf-Wert des Ausgangsproduktes lag bei 0,23.

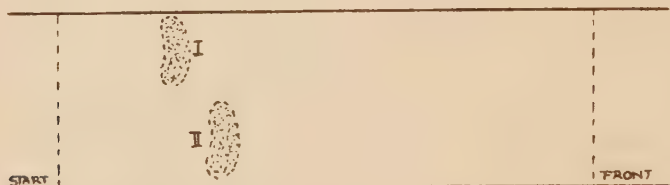


Bild 18. Papierchromatogramm auf SS 2043b, aufsteigend, Butanol, wassergesättigt.

- I S-Benzoyl-bisorpantethein-4'-phosphat
II S-Benzoyl-bisorpantethein-4'-phosphat-O²'-acetal

Für die weitere Umsetzung zum Analogen des Dephospho-CoA wurde die oben erhaltene Reaktionsmischung mit einem Überschuss trockenen Pyridins versetzt und dann, genau wie beim S-Benzoyl-bisnor- α -desoxydephospho-CoA beschrieben (s.S.37), mit AMP und Dicyclohexylcarbodiimid behandelt. Die gewünschte Bildung des S-Benzoyl-bisnordephospho-CoA trat jedoch kaum ein. Aus mehreren Ansätzen ließen sich jeweils nur papierchromatographisch eben nachweisbare Spuren des Dephospho-CoA-analogen erkennen. Dagegen konnte reichlich DAPP nachgewiesen werden.

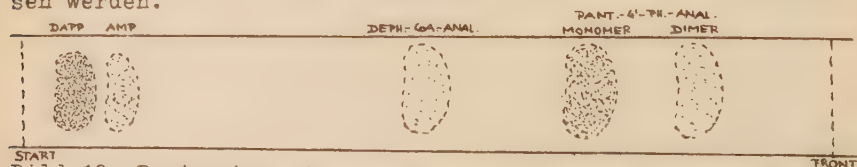


Bild 19. Papierchromatogramm des Reaktionsgemisches SS 2043b, Butanol : Eisessig : Wasser = 50 : 20 : 30.

Ein Versuch, Pantethein-4'-phosphat-S, $O^{2'}$ -dibenzyl-Äther (92) nach derselben Methode mit AMP umzusetzen, war ebenfalls erfolglos, obwohl bei einem Ansatz das substituierte Pantetheinphosphat mit Dicyclohexylcarbodiimid vorbehandelt wurde, um die Bildung der Carbodiimid-Esterphosphat-Verbindung (s. Schema S.37, IVb) zu fördern. Auch hier wurde reichlich DAPP gebildet, das gewünschte S, $O^{2'}$ -Dibenzyl-dephospho-CoA jedoch nur in so geringer Menge, dass die Möglichkeit, auf diesem Wege Dephospho-CoA in präparativem Ausmaß darzustellen, entfällt.

Zur Erklärung dieser Ergebnisse kann eine sterische Hinderung angenommen werden, die zwar dem ausladenden Molekül des Carbodiimids eine Annäherung an die freistehende Phosphatgruppe des Bisnor- α -desoxypantethein-4'-phosphats gestattet, bei den beiden anderen Verbindungen jedoch durch die benachbarten voluminösen Methyl- und Benzylgruppen bzw. die Acetalgruppe zu einer Abdrängung des Carbodiimids führt.

Der Aufbau der Molekülmodelle aus Atomkalotten nach Stuart und Briegleb unterstützte diese Ansicht. In diesen Modellen sieht man, dass bei den sterisch benachteiligten Formen die Phosphatgruppen weitgehend abgeschirmt sind und zwar stärker durch die Benzyl- und Acetalgruppierung als durch die Methylgruppen, wie in Bild 20 (s.S.50) gezeigt ist.

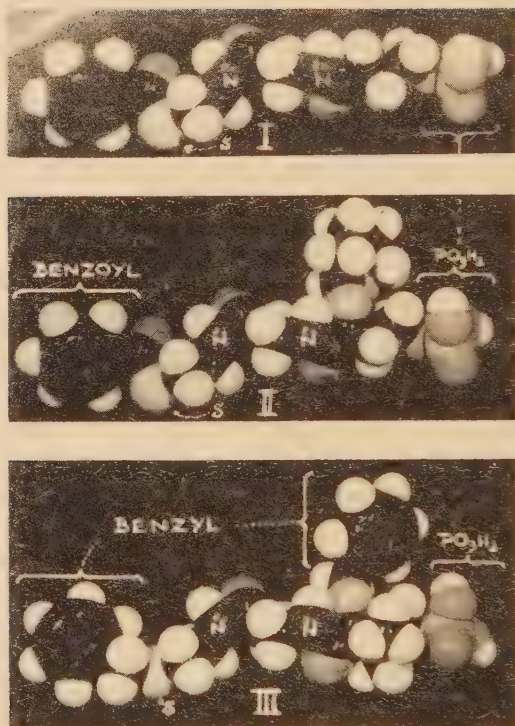


Bild 20. Atomkalottenmodelle von

- I S-Benzoyl-bisnor- α -desoxypantethein-4'-phosphat
- II S-Benzoyl-bisnor-pantethein-4'-phosphat-2'-tetrahydropyranylacetal
- III Pantethein-4'-phosphat-S,O^{2'}-dibenzyläther

Versuch zum Aufbau eines Analogens des Coenzym-A

Im Organismus wird das Coenzym-A aus seiner Vorstufe, dem Dephospho-CoA durch das Ferment Dephospho-CoA-Kinase (93) mit Hilfe von ATP gebildet.



Diese Reaktion führt die Phosphatgruppe in 3'-Stellung der Ribose ein (94).

Eine chemische Synthese des Analogens des Dephospho-CoA war nicht möglich, da in der Ribose zwei freie, gleichwertige OH-Gruppen vorliegen, die weder den selektiven Schutz der 2'-OH-Gruppe noch die selektive chemische Phosphorylierung der 3'-OH-Gruppe erlauben.

Ich versuchte deshalb, durch Inkubation von synthetischem β -Benzoyl-bisnor- α -desoxy-dephospho-CoA mit Dephospho-CoA-Kinase und ATP die CoA-Stufe der Verbindungsreihe zu erhalten. Den Ablauf der Reaktion konnte ich mit Hilfe der Papierelektrophorese verfolgen, da sich Coenzym-A und Dephospho-CoA durch ihre verschiedenen Wanderungsgeschwindigkeiten unterscheiden lassen. Nach der Inkubation stoppte ich die Reaktion durch Zusatz von Amberlite IR 120 und zentrifugierte das ausgefallene Protein ab. Nach der Gefriertrocknung brachte ich den Rückstand, in wenig Wasser aufgenommen, auf das Papier.

Die Streifen wurden nach der Elektrophorese auf Thiolester und Phosphat entwickelt und ergaben folgendes Bild (s.S.52).

Zunächst zeigte es sich, dass die beiden verwendeten Fermentextrakte - einer aus Schweineleber (95), der andere aus Taubenleberacetonepulver (93) - aktiv waren, da mit ATP inkubiertes S-Benzoyldephospho-CoA in S-Benzoyl-CoA übergeführt wurde (Streifen I und IV). Das unter genau denselben Bedingungen inkubierte S-Benzoyl-bisnor- α -desoxydephospho-CoA wurde jedoch nicht phosphoryliert

(Streifen II und V). Eine Hemmung des Enzyms durch das Dephospho-CoA-analoge konnte ich - wie Streifen III zeigt - nicht beobachten. Hier hatte ich S-Benzoyldephospho-CoA und das „Analoge“ inkubiert, wobei das natürliche Substrat in S-Benzoyl-CoA übergeführt wurde. Auf Streifen VI trug ich zur Kontrolle S-Benzoyl-CoA auf, das durch Glutathion verunreinigt war.

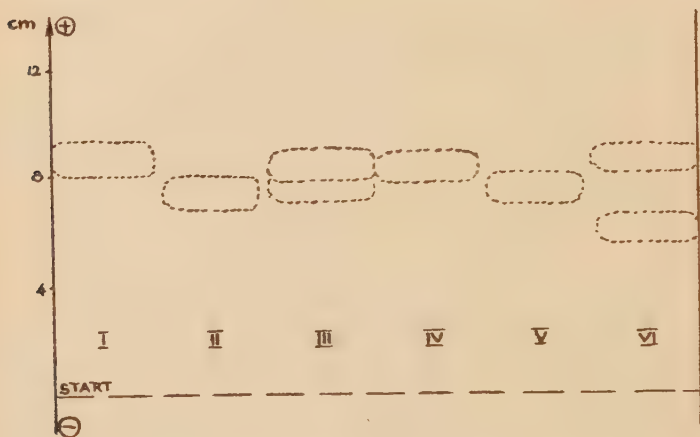


Bild 21. Elektropherogramm, Pyridinacetat pH 6,6 , 36 V/cm, 60 - 70 mA, Laufzeit 2 Stunden.

- I S-Benzoyl-dephospho-CoA mit ATP inkubiert
 - II S-Benzoyl-bisnor- α -desoxy-dephospho-CoA mit ATP inkubiert
 - III I + II mit ATP inkubiert
 - IV wie I, doch Ferment aus Taubenleberacetonepulver
 - V wie II, Ferment wie IV
 - VI Benzoyl-CoA (+ Glutathion)
- I, II, III mit Ferment aus Schweineleber inkubiert.

Die Struktur des Pantothylsäureteils scheint also für diese Reaktion so wesentlich zu sein, dass die veränderte Form von Enzym Dephospho-CoA-Kinase nicht mehr umgesetzt wird. Welche der fehlenden Gruppen - die α -OH-Gruppe oder die β -Methylgruppen - für die Unwirksamkeit des Substrates ausschlaggebend war, kann vorerst noch nicht entschieden werden. Damit komme ich auf die anfangs geäußerte Vermutung zurück,

die fehlende Vitaminwirkung von Pantothenensäureanalogen sei auf das Unvermögen des Organismus zurückzuführen, derartig veränderte Moleküle in das Coenzym-A einzubauen.

Der eben beschriebene Versuch unterstützt diese Ansicht.

Es wäre in diesem Zusammenhang von Interesse, zu prüfen, in wie weit die Enzyme des Pantethein synthetisierenden Systems und Pantethein-Kinase fähig sind, Analoge der Pantothenensäure zu Analogen des Pantetheinphosphats aufzubauen.

Versuche über die Affinität der Analogen zu Coenzym-A-abhängigen Enzymen

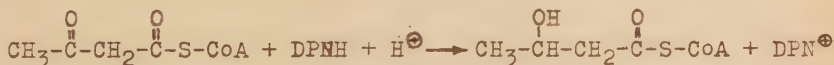
Wie früher ausgeführt wurde, war ein Zweck der vorliegenden Untersuchungen, durch die chemische Abwandlung des Pantetheins, des Pantetheinphosphats und des Dephospho-CoA Aufschluss über die Bedeutung der einzelnen Gruppen des Pantoylsäureteils bei der Bindung des Coenzym-A an die Enzyme zu erhalten.

Durch das Entgegenkommen von Frl. Dr.M. Grassl (96) und Herrn W. Gruber (92) war es möglich, solche Messungen an den von mir synthetisierten Verbindungen durchzuführen. Die studierten Reaktionen waren:

1) Thiolasereaktion.



2) B-Hydroxyacyl-dehydrogenasereaktion.



3) Crotonasereaktion.



Dabei wurde das Coenzym-A jeweils durch die synthetisierten Mercaptane ersetzt. Die Acetacetylderivate wurden

durch Umsetzung des mit Alkali verseiften S-Benzoylmercaptans mit Diketen nach D e c k e r (97) hergestellt, während die β -Oxy-butyrylderivate aus der Umsetzung des entsprechenden β -Laktons mit den Mercaptanen zu erhalten waren.

In der folgenden Tabelle sind die Michaeliskonstanten für die drei Reaktionen zusammengestellt, wie sie von Frl.Dr.Grassl und Herrn Gruber gemessen wurden (G = Dr.Grassl, alle anderen Gruber).

Mercaptan	Thiolase		β -Oxyacyldehydrogenase	Crotonase
	Donator	Acceptor		
Pantethein (nat.)	$5 \cdot 10^{-5}$	$50 \cdot 10^{-5}$	$0,4 \cdot 10^{-4}$	$200 \cdot 10^{-5} (G)$
Pantethein (nicht nat.)	$5 \cdot 10^{-5}$	$50 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{-4}$	
Pantetheinphosphat (nat.)	$5 \cdot 10^{-5}$	$50 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-4}$	
Pantetheinphosphat (nicht nat.)	$5 \cdot 10^{-5}$	$50 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-4}$	
Bisnor-desoxypan-tethein	$5 \cdot 10^{-5}$	$50 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{-4} (G)$	$83 \cdot 10^{-5} (G)$
Bisnor-desoxypan-tetheinphosphat			$11 \cdot 10^{-4} (G)$	$20 \cdot 10^{-5} (G)$
Bisnor-desoxyde-phospho-CoA			$10 \cdot 10^{-4} (G)$	
Bisnorpan-tethein	$5 \cdot 10^{-5}$	$50 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{-4}$	
Bisnorpan-tethein-phosphat	$5 \cdot 10^{-5}$	$50 \cdot 10^{-5}$	$15 \cdot 10^{-4}$	
N-Acetylaethen	$5 \cdot 10^{-5}$		$14 \cdot 10^{-4} (G)$	
N-Acetyl-cyste-amin	$12 \cdot 10^{-5}$		$100 \cdot 10^{-4} (G)$	
Dephospho-CoA			$1,0 \cdot 10^{-4} (G)$	$2 \cdot 10^{-5} (G)$
Coenzym-A			$0,5 \cdot 10^{-4} (G)$	$6,3 \cdot 10^{-5} (G)$

Gemessene Michaelis-Konstanten

Bei der Th i o l a s e r e a k t i o n unterscheidet man zwischen Acceptor- und Donatorfunktion, da der Thioalkohol einerseits in Form der Acetacetylverbindung, andererseits in freier Form als spaltendes Agens eingesetzt wird.

Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass die Affinität des Substrats zum Enzym Thiolase von der Struktur des Thioalkohols weitgehend unabhängig ist. Dass die Pantoylsäure als Baustein des Cofaktors keine große Rolle spielt, kann einerseits daraus geschlossen werden, dass sie ohne Affinitätsverlust durch den Acetylrest zu ersetzen ist [N-Acetylalethein (66)] und dass sich andererseits die veränderten Moleküle Bisnor- α -desoxy- und Bisnorpanthethin in ihrer Affinität von dem natürlichen Pantethin nicht unterscheiden. Dagegen kann man den β -Alaninrest der Pantothensäure als wichtigen Baustein ansehen, denn seine Entfernung aus dem Molekül führt zu einem deutlichen Affinitätsabfall, wie am N-Acetylcysteamin gezeigt ist. Hier wurde der im N-Acetylalethein noch vorhandene β -Alanylrest durch den Acetylrest ersetzt.

Anders ist es bei der β -H y d r o x y a c y l - d e - h y d r o g e n a s e . Hier ist zunächst bemerkenswert, dass das S-Acetacetyl-pantethin die maximale Affinität des S-Acetacetyl-CoA erreicht, sogar die des S-Acetacetyl-dephospho-CoA übertrifft. Daraus kann man schließen, dass die Pantoylsäure der Träger der Bindungsfunktionen ist, zumal noch zwei weitere Fakten für ihre große Bedeutung sprechen:

Einmal erfährt der Affinitätsanstieg von N-Acetylcysteamin zu N-Acetylalethein um den Faktor 7 eine weitere, wesentlich größere Steigerung um den Faktor 35 durch die Einführung der Pantoylsäure zum Pantethin. Zum anderen erfolgt durch die Phosphorylierung der OH-Gruppe in 4'-Stellung ein Affinitätsabfall, der auch durch die Einführung der Adenylsäurekomponente nicht ausgeglichen wird,

eine Tatsache, die der γ -OH-Gruppe eine gewisse Rolle gibt. Nach diesen Ergebnissen ist die Bedeutung der kompliziert gebauten Pantothersäure im Coenzym der β -Hydroxyacyldehydrogenase einleuchtend.

Die Tabelle zeigt weiterhin, dass die Affinität des S-Acetylacetyl-bisnordesoxypantetheins - wie man aus dem eben Gesagten erwarten kann - wesentlich geringer ist, als die des Pantetheins, dass die Wiedereinführung der α -OH-Gruppe im S-Acetylacetyl-bisnorpanethein aber ohne Effekt bleibt. Diese Erscheinung ist zunächst unverständlich, kann man doch annehmen, dass eine funktionelle Gruppe in dem als wesentlich erkannten Molekülteil einen Einfluss zeigen sollte.

Die Erklärung dieses Ergebnisses sehe ich darin, dass für das Funktionieren der Pantothersäure als Bindungsträger an das Enzym nur die im natürlichen Produkt vorhandene Kombination der α -OH-Gruppe und der β -Methylgruppen entscheidend ist. Daraus kann man schließen, dass hier eine sehr genaue sterische Fixierung an das Enzym erfolgt, die durch Entfernung einer oder mehrerer der genannten Gruppen nicht mit der notwendigen Exaktheit stattfinden kann. Für diese offenbar sehr genaue sterische Fixierung spricht auch der Affinitätsabfall um den Faktor 10 bei Verwendung der nicht natürlichen Form des Pantetheins.

Im Falle des eingesetzten Bisnorpanetheins ist zu bemerken, dass die Verbindung als Racemat eingesetzt wurde und der Wert der Michaeliskonstanten von $15 \cdot 10^{-4}$ darum nicht als endgültig angesehen werden darf.

Völlig übersichtlich scheinen die Verhältnisse bei der C r o t o n a s e . Hier deuten die Michaeliskonstanten daraufhin, dass die Adenylsäure eine wesentliche Funktion bei der Bindung des Substrats an das Enzym übernimmt. So steigt die Affinität von S- β -Oxybutyrylpantethein (I) ($K_M = 2 \cdot 10^{-3}$) zum S- β -Oxybutyryldephospho-CoA (II) ($K_M = 2 \cdot 10^{-5}$) um zwei Zehnerpotenzen, während bei den Bisnor- α -

desoxyanalogen der Unterschied zwar deutlich, aber lange nicht so ausgeprägt ist:

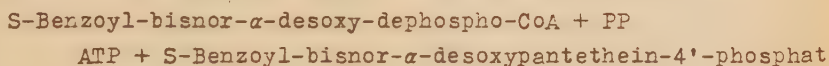
S- β -Oxybutyryl-bisnor- α -desoxypantethein (III)
 $(K_M = 8,3 \cdot 10^{-4})$

S- β -Oxybutyryl-bisnor- α -desoxydephospho-CoA (IV)
 $(K_M = 2 \cdot 10^{-4})$

Unverständlich ist die um den Faktor 2,5 größere Affinität des Bisnor- α -desoxypantethein (III) im Vergleich mit dem natürlichen Produkt (I), die mit dem Affinitätsverhältnis von (II) zu (IV) nicht im Einklang steht:

$$\frac{K_{M \text{ I}}}{K_{III}} = 2,5 \qquad \frac{K_{M \text{ II}}}{K_{M \text{ IV}}} = 0,1$$

An dieser Stelle ist auch noch einmal auf die Ergebnisse mit den Enzymen Dephospho-CoA-pyrophosphorylase und Dephospho-CoA-kinase hinzuweisen. Wie ich zeigen konnte, wird S-Benzoylbisnor- α -desoxydephospho-CoA durch das Enzym Dephospho-CoA-pyrophosphorylase gespalten nach:



Es liegen für die Reaktion keine Messungen der Michaeliskonstanten vor, so dass wir die Affinität des natürlichen Substrates Dephospho-CoA und die des analogen synthetischen Produktes nicht vergleichen können. Doch lässt der Ablauf der Reaktion darauf schließen, dass die Veränderung am Substrat keine tiefgreifende Änderung der Affinität mit sich bringt.

Dabei ist folgender Unterschied zu beachten: Bei den vorher besprochenen Reaktionen hatten die an Stelle des Coenzym-A eingesetzten „Analoge“ Coenzymcharakter. Bei der zuletzt besprochenen Reaktion ist das Analoge des Dephospho-CoA Substrat und unterliegt der Veränderung durch Spaltung der Pyrophosphatbrücke.

Dasselbe gilt für die Reaktion:



die - wie bereits gesagt - bei Inkubation des S-Benzoyl-bis-nor- α -desoxydephospho-CoA nicht stattfindet. Hier scheint die Veränderung im Pantoylsäureteil die Fixierung an das Enzym völlig zu verhindern.

Diese beiden Ergebnisse zeigen wieder, dass das Geschehen im Enzym-Substrat-Komplex recht undurchsichtig ist. Es wäre einleuchtend, wenn die pyrophosphorolytische Spaltung des Bisnor- α -desoxydephospho-CoA nicht stattfinden würde, da ja das veränderte Pantetheinphosphat auf irgend eine Weise an das Enzym gebunden werden muss. Dagegen ist es bemerkenswert, dass eine Reaktion, die eine Veresterung am Adenosin-
teil des Moleküls bewirkt, nicht eintritt, weil das Molekül im Pantetheinteil, also an einem recht entfernten Punkt, verändert wurde. Das Umgekehrte hätte man eher erwartet.

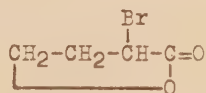
Immerhin lässt sich sagen: Die von mir synthetisierten Verbindungen und die damit vorgenommenen enzymatischen Versuche lassen auf eine wesentliche Bedeutung der Pantoylsäure bei der β -Hydroxyacyldehydrogenase- und Dephospho-CoA-kinasereaktion schließen. Bei der Crotonase- und Thiolasereaktion dagegen scheint die Pantoylsäure keine wesentliche Funktion zu haben.

Ausführung der Versuche und Messergebnisse

α -Brom- γ -butyrolakton

MG = 164,996

[Literatur: J.E.Livak et al. (44)]



Ansatz:

245 g (2,7 Mol) γ -Butyrolakton (Sdp. 206°C) wurden in einem mit Rückflusskühler, zum Boden reichenden Thermometer und Rührer versehenen 500-ml-Kolben gebracht und der Inhalt in einem Ölbad auf 100°C erhitzt. Dann wurden im Laufe von 7 Stunden unter Rühren 450 g Brom (2,7 Mol) durch einen bis zum Boden reichenden Tropftrichter zugetropft, während des Zutropfens die Temperatur langsam auf 130°C gebracht und die Mischung nach Beendigung der Bromzugabe noch 4 Stunden unter Rühren bei 130°C gelassen. Die Destillation ergab - neben einem Vorlauf - bei 140-145°C (12 mm Hg) übergehendes α -Brom- γ -butyrolakton.

Ausbeute: 430 g = 95 %

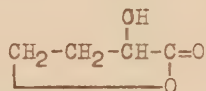
Das Produkt lieferte mit alkalischer Hydroxylaminlösung eine Hydroxamsäure, die durch salzsaure Ferrichloridlösung als violetter Komplex nachgewiesen werden konnte.

Ausserdem ergab nach kurzem Kochen mit Ätzkali und Ansäuern ein Zusatz von Silbernitrat eine Fällung von Silberbromid.

α -Oxy- γ -butyrolakton

MG = 102,088

[Literatur: A.C.J.Opfermann (45)]



Ansatz:

In einem 3-Liter-Kolben wurde eine Lösung von 570 g (4,1 Mol) Kaliumcarbonat in 1,7 Liter Wasser gebracht und auf 95°C erwärmt. Dann wurden unter Rühren innerhalb 2 Stunden 430 g (2,6 Mol) α -Brom- γ -butyrolakton zugetropft, wobei gegen Ende der Reaktion CO₂-Entwicklung auftrat. Nach dem Abkühlen wurde vorsichtig mit konz. Salzsäure auf pH 1 gebracht und das Wasser bei 60°C Badtemperatur i.V. abgezogen. Die große Menge ausfallender Salze wurde zwischendurch abgesaugt. Dann wurden die abgesaugten Salze und der Rückstand 3 mal mit je 250 ml abs. Alkohol extrahiert, der Alkohol i.V. abgezogen und die Extraktion beim Rückstand wiederholt.

Nach Abziehen des Äthanolts konnte der Rückstand im Hochvakuum destilliert werden und ergab nach einem Vorlauf von γ -Crotonylakton bei 86-90°C (0,01 mm Hg) übergehendes α -Oxy- γ -butyrolakton.

Ausbeute: 125 g = 50 %

Ein nach Umsetzung mit Benzoylchlorid nach Schotten-Baumann erhaltenes α -Benzoyl- γ -butyrolakton schmolz bei 96-97°C.

Analyse: $C_{11}H_{10}O_4$ MG = 206,19

Einwaage: 2,584 mg; Wasser: 1,148 mg; CO_2 : 6,073 mg

Berechnet: C 64,00 % H 4,89 %

Gefunden: C 64,14 % H 4,97 %

1 g des Laktons und 1 ml Phenylhydrazin wurden in 5 ml Äthanol 1 Stunde am Rückfluss gekocht. Nach dem Abkühlen wurden 20 ml Äther zugetropft und der ausfallende Kristallbrei aus Essigester umkristallisiert. Feine, weiße Nadeln von α - γ -Dioxybuttersäurephenylhydrazid. Smp. 130°C.

Die Titration von 246 mg des Laktons mit Natronlauge ergab einen Verbrauch von 23,96 ml m/10 NaOH (berechnet: 24,1 ml).

Das I.R.-Spektrum zeigt Bild 22.

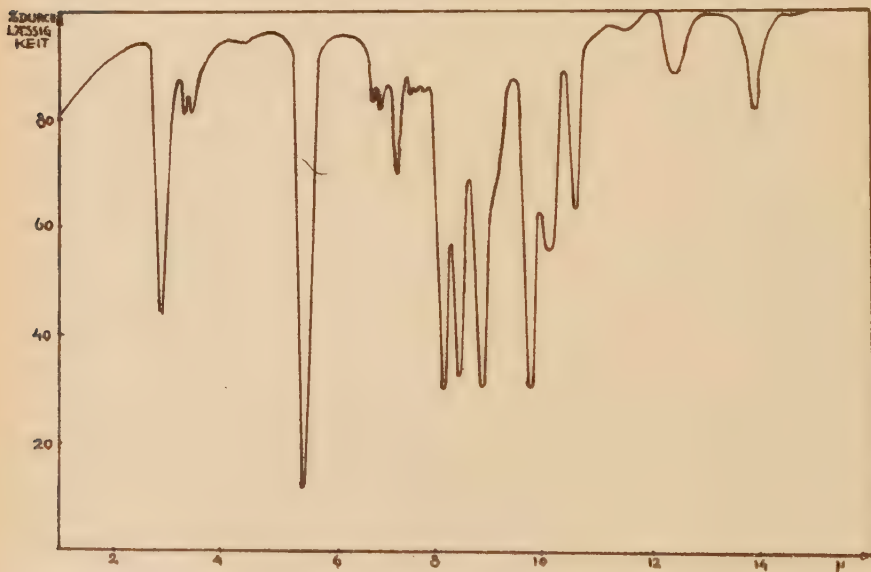


Bild 22. I.R.-Spektrum des α -Oxy- γ -butyrolaktone

Schutz der α -OH-Gruppe mit Dinitrobenzoesäure

Ansatz:

10,4 g 3,5-Dinitrobenzoesäure und 10,3 g Phosphorpentachlorid wurden in 70 ml abs. Äther erwärmt, bis sich das Phosphorpentachlorid gelöst hatte, Nach einer weiteren halben

Stunde wurde der Äther und das gebildete Phosphoroxychlorid abgezogen und der Rückstand aus leichtsiedendem Petrol-Äther umkristallisiert.

Das so erhaltene 3,5-Dinitrobenzylchlorid wurde zusammen mit 5,4 g α -Oxy- γ -butyrolakton in 200 ml abs. Benzol gebracht und mit einem Vitromischer fein verteilt. Nun wurde langsam 3,7 g trockenes Pyridin zugetropft, eine Stunde erwärmt, anschließend mit dem gleichen Volumen Essigester verdünnt und 2 mal mit je 50 ml verd. Schwefelsäure, 6 mal je mit 50 ml Natriumbicarbonatlösung und 3 mal mit je 50 ml Wasser gewaschen. Über Nacht wurde mit Calciumchlorid getrocknet und nach Filtration der Lösung das Lösungsmittel abgezogen. Die verbleibende, hellgelbe, kristalline Masse wurde aus Essigester umkristallisiert und schmolz bei 137°C.

Ausbeute: 8 g = 74 %

500 mg dieses α -Dinitrobenzoyl- γ -butyrolaktone wurden mit 110 mg Na-Salz des β -Alanins nach Barnett in 10 ml abs. Methanol umgesetzt. Beim Abkühlen entstand ein feinkristalliner Niederschlag, der abgenutscht wurde. Smp. 107°C.

Aus Äthanol-Wasser umkristallisiert schmolz das ätherlösliche Produkt bei 111°C.

Es handelte sich um den 3,5-Dinitrobenzoesäuremethylester (Smp. 112°C).

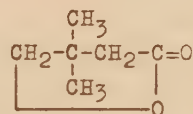
$\beta\beta$ -Dimethyl- γ -butyrolakton

MG = 114,140

a) aus Neopentylglycol

α) Neopentylglycol MG = 104,154

[Literatur: F.C. Whitmore et al. (56)]



Ansatz:

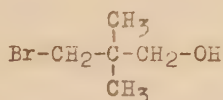
100 g Isobutyraldehyd und 300 ml Formalin wurden in 200 ml Äthanol gelöst und innerhalb von 2 Stunden in eine Lösung von 98 g Kaliumhydroxyd in 400 ml Äthanol getropft. Nach 18 stündigem Kochen am Rückfluss wurde das Äthanol abdestilliert, der Rückstand mit Äther extrahiert und dieser nach dem Trocknen abgedampft. Die Destillation des Rückstandes im Säbelkolben ergab bei 100-110°C (14 mm Hg) übergehendes Neopentylglycol vom Smp. 119-122°C.

Ausbeute: 68 g = 50 %

b) 3-Brom-2,2-dimethyl-propanol-1

MG = 167,058

[Literatur: A. Franke (58)]



Ansatz:

36 g (0,35 Mol) Neopentylglycol wurden in 550 ml rauchender Bromwasserstoffsäure gelöst und in sieben Bombenrohren 10 Stunden auf 100°C erhitzt.

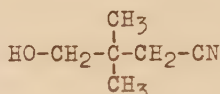
Das Reaktionsgemisch wurde in Wasser gegossen und ausgeäthert, der Ätherextrakt mit Bicarbonat gewaschen, getrocknet und eingedampft.

Die Destillation des rotbraunen Rückstandes führte zu einem schwach violetten 3-Brom-2,2-dimethyl-propanol-1, das bei 72-77°C (12 mm Hg) überging.

Ausbeute: 14,7 g = 26 %

γ) γ-Oxy-ββ-dimethylbutyronitril

MG = 113,160



Ansatz:

8,4 g (50 mmol) 3-Brom-2,2-dimethylpropanol-1 wurden in 30 ml Äthanol gelöst, nach Vermischen mit einer Lösung von 3,2 g (55 mmol) Kaliumcyanid in 10 ml Wasser, 8 Stunden am Rückfluss gekocht. Dann wurde der Alkohol abgezogen, die wässrige Phase ausgeäthert und das nach Trocknen und Abziehen des Äthers verbleibende rohe Nitril i.V. destilliert. Siedepunkt des farblosen Oels: 72-74°C (12 mm Hg).

Ausbeute: 4,6 g = 82 %

Das Reaktionsprodukt entwickelte beim Kochen mit Natronplätzchen Ammoniak und ergab keine Fällung mit Silbernitrat.

δ) ββ-Dimethyl-γ-butyrolakton

MG = 114,14

Ansatz:

8 g Nitril wurden in 35 ml eines Gemisches konz. Schwefelsäure, Eisessig, Wasser (1 : 1 : 1) am Rückfluss gekocht. Nach Zusatz von Wasser wurde anschließend ausgeäthert und die Ätherphase zur Entfernung der Essigsäure mit Bicarbonatlösung gewaschen. Nach Abziehen des Äthers wurde der Rückstand 2 mal i.V. destilliert. Das farblose Lakton ging bei 81-83°C (12 mm Hg) über.

Ausbeute: 4,5 g = 55 %

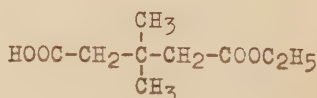
Die Umsetzung mit alkalischer Hydroxycyanidlösung lieferte eine Hydroxamsäure, die an der Färbung des Ferrichloridkomplexes erkannt wurde.

Bei der Titration von 198 mg des Laktons mit m/10 NaOH wurden 17,40 ml Natronlauge verbraucht (berechnet: 17,36 ml).

b) aus ββ-Dimethylglutarsäure

α) ββ-Dimethylglutarsäurehalbester

MG = 188,218



[Literatur: F.L.M.Pattison et al. (60)]

Ansatz:

135 g (0,84 Mol) ββ-Dimethylglutarsäure (Smp. 100°C) wurden mit 220 g (2,1 Mol) Essigsäureanhydrid 4 Stunden am

Rückfluss gekocht. Nach dem Abdestillieren der entstandenen Essigsäure kristallisierte das $\beta\beta$ -Dimethylglutarsäureanhydrid aus dem Essigsäureanhydrid. Es wurde nach dem Absaugen im Exsiccator über Natronplättchen getrocknet (Smp. 121°C) (Lit. 123°C). Ohne weitere Reinigung wurde das Anhydrid in eine Lösung von 18 g Natrium in 500 ml abs. Alkohol gebracht, 1 Stunde am Rückfluss gekocht und dann der Alkohol abdestilliert. Beim Versetzen des Rückstandes mit verd. Salzsäure schied sich der Halbester ab. Die Destillation i.V. ergab eine bei $167-174^{\circ}\text{C}$ (28 mm Hg) übergehende, angenehm riechende Flüssigkeit.

Ausbeute: 110,5 g = 71 %

B) Der Abbau nach Hunsdiecker (55)

Ansatz:

76 g (0,62 Mol Ag) frischbereitetes und gutgewaschenes Silberoxyd und 110 g (0,59 Mol, $\beta\beta$ -Dimethylglutarsäurehalbesters wurden in zwei $1/2$ Liter Wasser mittels Vibromischer fein emulgiert. Die braunschwarze Farbe der Emulsion ging in ein helles Grau über. Die seidig glänzenden Kristalle des Silbersalzes wurden abgesaugt und mit Wasser und Äthanol gewaschen. Anschließend wurde der scharf abgesaugte Kristallkuchen zerstoßen und 24 Stunden im Vakuumtrockenschrank bei $50-70^{\circ}\text{C}$ getrocknet. Nachdem die Masse in einer Kugelmühle zermahlen und fein gesiebt war, wurde das Pulver nochmal 24 Stunden i.V. bei 60°C getrocknet und ergab 145 g Silbersalz des $\beta\beta$ -Dimethylglutarsäurehalbesters.

Das Silbersalzpulver wurde nun in einen 2-1-3-Halskolben gebracht und 1,3 Liter Tetrachlorkohlenstoff eindestilliert. (Der Tetrachlorkohlenstoff war schon zweimal vorher über Phosphorpentoxyd destilliert worden.) Dann wurde ein Kühler, Rührer und Tropftrichter aufgesetzt und im Lauf einer halben Stunde 78 g Brom zugetropft. Nachdem die Bromfarbe bestehen blieb, wurde eine halbe Stunde am Rückfluss gekocht, abgekühlt, vom gebildeten Silberbromid abgesaugt und die Lösung mit Natriumcarbonatlösung bromfrei gewaschen. Nach der Destillation des Lösungsmittels wurde der γ -Brom- $\beta\beta$ -dimethylbuttersäureester destilliert und ging bei 92° bis 94°C (12 mm Hg) über.

Ausbeute: 66,5 g = 64 % des eingesetzten Silbersalzes.

Der so erhaltene γ -Brom- $\beta\beta$ -dimethylbuttersäureäthylester (66,5 g) wurde in einer Mischung von 150 ml Wasser, 40 ml Äthanol und 50 g Kaliumhydroxyd so lange am Rückfluss gekocht, bis die Mischung homogen war (ca. 6 Stunden). Beim Ansäuern mit Salzsäure auf pH 1 schied sich das Laktol ab. Es wurde in Äther aufgenommen, die Ätherphase mit Bicarbonat geschüttelt und getrocknet. Nach dem Abziehen des Äthers blieb das rohe $\beta\beta$ -Dimethyl- γ -butyrolaktol, das durch zweimalige Destillation i.V.

gereinigt und dabei in der Vorlage fest wurde. Sdp. $82-83^{\circ}\text{C}$ (12 mm Hg).

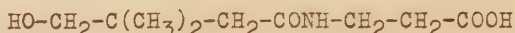
Ausbeute: 31 g = 92 %

Die Reaktionen waren dieselben, wie auf Seite 62 beschrieben.

Aufbau der Pantothensäureanalogen

a) nach Williams (38) (α -Desoxypantothensäure)

MG = 203,234



Ansatz:

3,15 g (28 mmol) Natriumsalz des β -Alanins und 3,3 g (24 mmol) $\beta\beta$ -Dimethyl- γ -butyrolakton wurden in einem verschlossenen Kolben 4 Stunden im Trockenschrank auf 100°C erhitzt. Dann wurde das Produkt, das, erst zäh, beim Abkühlen zu einer steinharten Masse erstarrte, mit einer Suspension von Amberlite IR 120 behandelt, bis alles gelöst war. Die Mischung wurde auf eine Säule frischen Austauschers gefüllt und das Eluat zur Entfernung überschüssigen Laktons zunächst ausgeäthert und nach dem Einengen auf etwa 30 ml gefriergetrocknet. Es blieben 5,2 g fast farblosen, sirupösen Rückstands. Um Spuren von β -Alanin zu entfernen, wurde in abs. Methanol aufgenommen und filtriert. Nach Abziehen des Methanols blieb reine α -Desoxypantothensäure.

Ausbeute: 5,1 g = 96 %

b) nach Barnett (36) (Bisnor-pantothensäure)

MG = 191,182



Ansatz:

13,8 g (135 mmol) α -Oxy- γ -butyrolakton und 15 g (135 mmol) Na-Salz des β -Alanins wurden in 70 ml abs. Methanol 1 Stunde am Rückfluss gekocht, dann schnell filtriert und unter Rühren in das 6-fache Volumen eiskalten, trockenen Äthers getropft. Die weiße Fällung stand über Nacht im Kühlraum, wurde dann abgesaugt und wie unter a) beschrieben mit Amberlite versetzt und weiter verarbeitet.

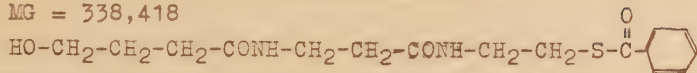
Ausbeute: 24,4 g Bisnor-pantothensäure = 94 %

Die Bisnor- α -desoxypantothensäure wurde ebenfalls nach Barnett mit 84-%iger Ausbeute hergestellt-

Zur Identifizierung wurden kleine Proben in zugeschmolzenen Reagenzgläsern mit conc. HCl verseift und neben nicht umgesetzten Proben papierchromatographiert (SS 2043b; Äthanol : conc. Ammoniak : Wasser = 80 : 4 : 16). Während die unverseiften Proben keine oder eine kaum wahrnehmbare Färbung mit Ninhydrin ergaben, zeigten die verseiften Proben die tiefblaue Ninhydrinfärbung des β -Alanins (Rf-Wert: 0,30 bis 0,32).

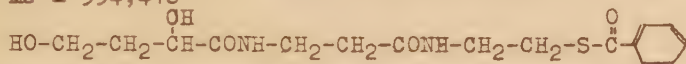
S-Benzoyl-bisnor- α -desoxypantethein und

MG = 338,418



S-Benzoyl-bisnorpantethein nach Schwyzer (61)

MG = 354,418



Ansatz:

5 g (28,5 mMol) Bisnor- α -desoxypantotheinsäure wurden in 12,5 ml trockenem Dimethylformamid gelöst und mit der äquimolaren Menge Triäthylamin (2,9 g) versetzt. Nachdem die Mischung auf -5°C gekühlt war, wurde unter Ausschluss von Feuchtigkeit eine Lösung von 2,5 g Chlorkohlensäureäthylester in 10 ml trockenem Essigester zuge tropft und die Mischung unter gelegentlichem Schütteln bei dieser Temperatur belassen. Nach 10 Min. tropfte ich die Mischung samt dem ausgefallenen Triäthylammoniumchlorid in eine auf -5°C gekühlte Lösung von 1,2 g Äthylenimin und 2,8 g Triäthylamin in 25 ml Essigester. Nach weiteren 20 Min. wurde die kalt gehaltene Mischung in eine eiskalte Lösung von 4 g Thiobenzoesäure in 50 ml trockenem Essigester gegossen, nach einer weiteren Stunde vom ausgefallenen Triäthylammoniumchlorid abfiltriert und die gelbe Lösung bei Zimmertemperatur i.V. eingeeengt. Nachdem der verbleibende, ölige Rückstand mit 600 ml Wasser versetzt worden war, wurde zunächst 5 mal mit Äther (je 100 ml), dann 10 mal mit Essigester ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen des Essigesters über CaCl_2 wurde dieser i.V. eingeeengt, wobei sich gegen Ende eine feinkristalline Masse abzuscheiden begann.

Die Umkristallisation erfolgte aus trockenem Essigester und führte zu weißen Kristallen vom Smp. 120°C .

Ausbeute: 1,85 g = 19 %

Spektrum: $\epsilon_{241 \text{ m}\mu} = 9900$; $\epsilon_{268 \text{ m}\mu} = 9000$;
(s. Bild 3, S.21)

Analyse: $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_4\text{N}_2\text{S}$ MG = 338,418

Einwaage₁: 3,313 mg Einwaage₂: 5,931 mg

Wasser 1,456 mg; N_2 0,436 ml; CO_2 6,92 mg
(24°C , 708 mm Hg)

Berechnet: C 56,77 % H 6,56 % N 8,28 %

Gefunden: C 56,88 % H 6,60 % N 7,87 %

S-Benzoyl-bisnorpantethein

wurde völlig analog hergestellt und ergab, aus Essigester umkristallisiert, weiße Kristalle vom Smp. 114°C in etwa 10 %iger Ausbeute.

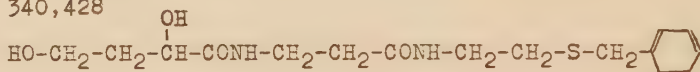
Spektrum: $\epsilon_{241 \text{ m}\mu} = 9850$; $\epsilon_{268 \text{ m}\mu} = 8900$;
(s. Bild 4, S.22).

Analyse: $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_5\text{N}_2\text{S}$ MG = 354,418

Einwaage₁: 2,795mg Einwaage₂: 4,078 mg
Wasser 1,550 mg; N₂ 0,283 ml; CO₂ 5,555 mg
(22°C, 717 mm Hg)
Berechnet: C 54,3 % H 6,24 % N 7,66 %
Gefunden: C 54,24 % H 6,21 % N 7,60 %

S-Benzyl-bisnorpantethein

MG = 340,428



Ansatz:

25 g (132 mMol) Bisnorpantothensäure wurden in 70 ml Dimethylformamid gelöst, 14 g Triäthylamin (138 mMol) zugesetzt und die Lösung auf -7°C gekühlt. Nach tropfenweisem Zusatz einer Lösung von 17 g (155 mMol) Chlorameisensäureäthylester in 70 ml Essigester wurde die Lösung 10 Min. bei -7°C belassen und dann 21,5 g Benzylcysteamin in 110 ml Essigester zutropft. Nach 1/2 Stunde wurde das Kältebad entfernt und der Lösung Gelegenheit gegeben, sich auf Zimmertemperatur zu erwärmen. Nach Verdünnen auf das doppelte Volumen mit Essigester wurde 2 mal mit verdünnter Schwefelsäure, 2 mal mit verdünnter Natronlauge und 3 mal mit Wasser ausgeschüttelt. Nun wurde die Lösung i.V. eingeeengt. Als Rückstand blieb ein gelbrotes Öl, das bei Zusatz von Äther fest wurde. Die Masse wurde zweimal aus Methanol-Wasser kristallisiert und ergab weiße Kristalle vom Smp. 114°C.

Ausbeute: 10,5 g = 23 %

N-Analyse: $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_4\text{N}_2\text{S}$ MG = 340,428

Einwaage: 3,138 mg Berechnet: 8,2 %
N₂: 0,236 ml Gefunden: 8,1 %
(28°C, 722 mm Hg)

Eine kleine Probe des S-Benzyl-bisnorpantetheins wurde nach Schotten-Baumann mit Benzoylchlorid umgesetzt. Das 2 mal aus Methanol-Wasser umkristallisierte S-Benzyl-bisnorpantethein-2',4'-dibenzoat schmolz bei 112-114°C.

Analyse: $C_{30}H_{30}O_7N_2S$ MG = 548,622

Einwaage₁: 2,304 mg; Einwaage₂: 3,790 mg

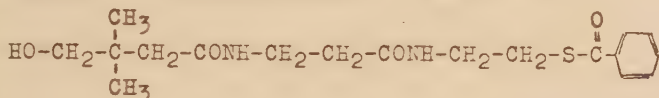
Wasser 1,229 mg; CO₂ 5,521 mg; N₂ 0,183 ml

(28°C, 722 mm Hg)

Berechnet: C 65,5 % H 5,89 % N 5,1 %

Gefunden: C 65,39 % H 5,97 % N 5,2 %

S-Benzoyl- α -desoxypantethein MG = 366,5



1. Ansatz:

2,3 g Alethinhydrochlorid wurden in abs. Äthanol gebracht, mit einer Lösung von 290 mg Na in abs. Äthanol versetzt und eine Stunde mit dem Vibromischer behandelt. Die vom ausgefallenen NaCl filtrierte gelbe Lösung wurde i.V. eingengt, an der Oelpumpe über Nacht getrocknet und mit einem Überschuss β , β -Dimethyl- γ -butyrolakton 4 Stunden auf 100°C erwärmt.

Die Mischung wurde in Äthanol-Essigester (1 : 1) aufgenommen, mit verdünnter, ammoniumsulfatgesättigter Schwefelsäure und ammoniumsulfatgesättigter Bicarbonatlösung gewaschen. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels wurde in Wasser aufgenommen, mit Natriumamalgam bei pH 8 - 9 reduziert und unter Stickstoff benzoiliert, bis kein freies SH mehr nachzuweisen war. Nach dreimaligem Ausschütteln der angesäuerten Lösung mit Äther wurde die Lösung mit Ammonsulfat gesättigt, erschöpfend mit Essigester extrahiert und die organische Lösung mit Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Abziehen des Essigesters blieb ein gelbes, zähes Öl.

Ausbeute: 480 mg

Rf-Wert: 0,78 (SS 2043bm, m/10 sec. Natriumphosphat)

Dem UV-Spektrum nach betrug der Reinheitsgrad des Präparats 85 % (s. Bild 7, S. 27).

2. Ansatz:

1 g α -Desoxypantotheinsäure wurde in 5 ml abs. Dimethylformamid gelöst und mit 0,665 ml trockenem Triäthylamin versetzt. Bei -10°C wurde nun unter Rühren eine kalte Lösung von 0,36 ml Chlorkohlensäureäthylester in 5 ml Dimethylformamid langsam zugetropft. Die Mischung wurde in der Kälte aufbewahrt.

1 g Cysteamin wurde in 60-%igem Alkohol bis zum Verschwinden einer positiven Nitroprussidreaktion mit Perhydrol versetzt, dann bis zur deutlichen sauren Reaktion Chlorkwasserstoff eingeleitet. Das in der Kälte auskristalli-

sierende Cystaminhydrochlorid wurde aus 75-%igem Alkohol umkristallisiert (Smp. 209-211 °C Zers.).

550 mg des getrockneten Salzes in 10 ml Wasser wurden mit 2 n NaOH bis zu einem pH von 8,5 versetzt und dann bei 0°C unter Einhalten dieses pH die Lösung des gemischten Anhydrids zugetropft. Nachdem noch 1/2 Stunde gerührt worden war, wurde i.V. völlig eingeeengt, nochmal Wasser zugesetzt und solange an der Pumpe belassen, bis der Rückstand sirupös wurde. Nun wurde in Äthanol-Essigester (1 : 1) aufgenommen und 4 mal mit ammoniumsulfatgesättigter, verd. Schwefelsäure ausgewaschen. Zur Entfernung der Schwefelsäure wurde 3 mal mit ammoniumsulfatgesättigter Bicarbonatlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und dann das Lösungsmittel abgezogen. Der ölige Rückstand reagierte neutral und gab eine kräftige Reaktion auf Disulfid.

Ausbeute: 860 mg Desoxy-pantethin.

Dieses ölige Produkt wurde mit Natriumamalgam bei pH 9 - 10 reduziert und unter sauerstofffreiem N_2 bei pH 7 - 8 benzoyliert, wobei 0,6 ml Benzoylchlorid verbraucht wurden (theor. 0,48). Nun wurde angesäuert, mit Ammonsulfat gesättigt, 3 mal mit Äther und anschließend mit Essigester ausgeschüttelt, bis kein Thioester mehr in der wässrigen Phase war. Die Essigesterfraktion wurde getrocknet und i.V. eingeeengt. Als Rückstand blieben 600 mg eines gelben Oels, das an der Ölpumpe sehr zäh wurde. Eine Verunreinigung durch Benzoesäure wurde durch Aufnehmen in 2 ml Essigester und Versetzen der Lösung mit 90 ml Petroläther entfernt, wobei das β -Benzoyl- α -desoxy-pantethin wieder als gelbes Öl ausfiel.

Ausbeute: 370 mg

Das Spektrum ließ nur auf eine 70-%ige Reinheit des Produktes schließen und zeigte immer noch eine kleine Verunreinigung durch Benzoesäure, was an der erhöhten 241 mp Bande erkennbar war.

15 mg des Oels wurden mit 0,4 ml conc. HCl im zugeschmolzenem Röhrchen 6 Stunden bei 100°C verseift. Die ausgefallene Benzoesäure wurde über Glaswolle abgetrennt und umkristallisiert. Ausbeute 3,8 mg (theor. 5 mg) Smp. 120°C.

Die Lösung wurde mit Äther extrahiert, der Äther eingedunstet und der Rückstand mit alkalischer Hydroxylaminlösung versetzt. Ein Teil wurde chromatographiert, SS 2043b, H_2O gesättigtes Butanol) $R_f = 0,7$, ein anderer Teil mit saurer Eisenchloridlösung versetzt. Violette Farbe. Das Chromatogramm des Rückstandes wurde durch die hohe Salzkonzentration unsauber und ergab mit Ninhydrin nur einen langgezogenen blauen Fleck. Die Salze wurden durch Zusatz von Äthanol ausgefällt und das Chromatogramm wiederholt (Butanol : Eisessig : Wasser = 50 : 20 : 30). Die Flecken der gesuchten Produkte konnten durch parallel laufende Vergleichsproben identifiziert werden ($R_{f\text{Cystamin}} = 0,17$; $R_{f\beta\text{-Alanin}} = 0,34$).

3. Ansatz:

4,5 g α -Desoxy-pantothensäure wurden, wie auf Seite 66 beschrieben, mit S-Benzylcysteamin umgesetzt und gereinigt und anschließend, wie auf Seite 71 beschrieben, im flüssigen Ammoniak mit Natrium reduziert.

Das bei den anschließenden Behandlungen des freien Merkap-tans mit Benzoylchlorid entstandene Produkt konnte aus der angesäuerten Lösung mit Essigester extrahiert werden.

Beim Abziehen des Essigesters blieb eine kristalline Masse, die aus Äther umkristallisiert wurde (Smp. 115-116°C).

Ausbeute: 1,7 g

Benzoylbestimmung nach Kuhn und Roth.

Einwaage: 33,6 mg = 92 μ Mol S-Benzoyl- α -desoxypantethein

= 92 μ Mol Benzoesäure

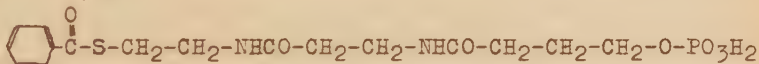
oder 71 μ Mol S-O^{2'}-Dibenzoyl- α -desoxypante-

= 142 μ Mol Benzoesäure thein

Die eingewogene Menge wurde mit 50 %iger Schwefelsäure ver-seift, die gebildete Benzoesäure mit Wasserdampf überge-trieben und mit m/50 NaOH gegen Phenolphthalein titriert. Verbrauch an NaOH m/50 = 7,27 ml, das entspricht 145 μ Mol Benzoesäure.

S-Benzoyl-bisnor- α -desoxypantethein-4'-phosphat

MG = 418,39



Ansatz:

In 25 ml über P₂O₅ destilliertes Chloroform wurden unter Durchleiten eines trockenen Stickstoffstromes 4,7 ml frisch destilliertes trockenes Pyridin und 340 mg frisch destil-liertes Phosphoroxychlorid eingebracht. Nachdem die Lösung in einem Eisbad gekühlt war, wurden 500 mg S-Benzoylbisnor- α -desoxypantethein in 10 ml Chloroform suspendiert und in die kalte Lösung getropft. Dabei lösten sich die Kristalle.

Die Mischung wurde 10 Min. bei 0°C belassen, das Eisbad entfernt und der Lösung Gelegenheit gegeben, sich auf Zim-mertemperatur zu erwärmen. Nach 1/2 Stunde wurde die hell-gelbe, klare Lösung auf 150 g Eis gegossen, die Chloroform-phase abgetrennt, die wässrige Phase zweimal mit Chloroform ausgeschüttelt und dann durch einen Kationenaustauscher Am-berlite IR 120 geschickt. Das Eluat versetzte ich nach dem Einengen i.V. auf 100 ml und Erwärmen der Lösung auf 100°C mit so viel Perchlorsäure, dass die Lösung 1 n an Perchlör-säure war und ließ die Mischung 7 Min. in einem siedenden Wasserbad. Dann wurde rasch gekühlt, mit einer der Per-chlorsäure entsprechenden Menge Kalilauge versetzt und vom ausgefallenen Kaliumperchlorat abgesaugt.

Nun wurde nochmal i.V. auf ein kleineres Volumen (40 ml) eingeeengt und erst mit 4, dann mit 2 ml Phenol ausgeschüttelt. Die vereinigten Phenolphasen wurden einmal mit 4 ml n/10 Schwefelsäure und 2 mal mit je 4 ml Wasser gewaschen, mit 35 ml Chloroform versetzt und solange mit 5 %iger Natriumbicarbonatlösung ausgeschüttelt, bis kein Thioester in der wässrigen Phase mehr nachzuweisen war. Die vereinigten Bicarbonatfraktionen wurden sofort mit soviel Amberlite IR 120 behandelt, dass alles CO₂ vertrieben wurde und dann durch eine frische Säule mit 20 ml desselben Austauschers in einer Messbürette geschickt.

Das saure Eluat wurde zunächst auf ein kleines Volumen eingeeengt und dann lyophilisiert. Als Rückstand blieb ein gelbbraunes Öl.

Ausbeute: 290 mg = 47 %

Bei anderen Ansätzen schwankte die Ausbeute zwischen 39 % und 56 %.

Die Kristallisation gelang aus Methanol, dem im Lauf von 14 Tagen zweimal täglich bis zur eben wahrnehmbaren Trübung Äther zugesetzt wurde.

Das in kleinen Nadelbüscheln kristallisierende S-Benzoylbisnor- α -desoxy pantethein-4'-phosphat schmolz bei 118-119°C.

Spektrum: $\epsilon_{241\text{mp}} = 9780$; $\epsilon_{268\text{mp}} = 9085$
(s. Bild 3, S.21)

Ein Elektropherogramm ergab eine minimale Verunreinigung von S-Benzoyl-bisnor- α -desoxy pantethein-4'-pyrophosphat (siehe Bild 8, S.30).

Die Phosphatbestimmung nach Martland und Robinson (98) ergab einen, auf das Spektrum bezogenen, etwas zu hohen Wert:

Einwaage: 4,4 mg (10,5 μMol) in 10 ml Wasser gelöst.

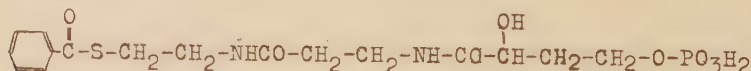
0,05 ml (0,525 μMol) verascht: E = 0,289 = 0,56 μMol

0,1 ml (1,05 μMol) verascht: E = 0,360 = 1,09 μMol

Diese erhöhten Werte sind auf die im Elektropherogramm nachgewiesenen Verunreinigungen durch Pyrophosphatester zurückzuführen.

S-Benzoyl-bisnor-pantethein-4'-phosphat nach Baddiley (48)

MG = 434



Ansatz:

3,02 g Dibenzylphosphit wurden in 50 ml trockenem Chloroform gelöst und 2 Stunden über geglühtem Natriumsulfat stehen gelassen. Dann wurde filtriert, das Natriumsulfat zweimal mit je 25 ml trockenem Chloroform gewaschen und die Lösung auf -15°C gekühlt. Bis zur Gelbfärbung der Lösung wurde nun

trockenes Chlor eingeleitet, dann so lange trockene Luft durch die Lösung geblasen, bis diese farblos war (65).

Nun wurden 3,9 g S-Benzyl-bisnorpentethin in 46 ml trockenem Pyridin gelöst, die Lösung auf -40°C gekühlt und die Lösung von Dibenzylphosphorochlorid in trockenem Chloroform langsam zugetropft. Nachdem die Lösung 20 Minuten bei -40°C gestanden hatte, wurde sie noch $3\frac{1}{2}$ Stunden bei Zimmertemperatur belassen und dann das Pyridin und das Chloroform i.V. bei Zimmertemperatur abgezogen. Nach Aufnehmen des Rückstandes in 100 ml Chloroform wurde dieses 4 mal mit je 10 ml 1 n Schwefelsäure, 3 mal mit je 5 ml verd. Natronlauge und 1 mal mit 10 ml Wasser gewaschen. Die Lösung wurde über Nacht über geglühtem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Chloroform abgezogen.

Als Rückstand blieben 4,3 g eines gelbbraunen Oels (S-Benzyl-bisnorpentethin-4'-dibenzylphosphat). Dieses Oel wurde in 3 ml abs. Methanol gelöst und in die Lösung eines kleinen Stückchens Natrium in 200 ml flüssigen Ammoniak getropft, wobei die blaue Farbe verschwand. Bis zur bleibenden Blaufärbung wurden 1,8 g Natrium in kleinen Stückchen zugegeben. Nachdem die Lösung am Ende der Reaktion $1\frac{1}{2}$ Stunde blau geblieben war, wurden zur Zerstörung überschüssigen Natriums 3,2 g Ammoniumchlorid zugesetzt, dann unter langsamen Einleiten sauerstofffreien Stickstoffs das Ammoniak abgedampft und zum Schluss $1\frac{1}{2}$ Stunden an der Wasserstrahlpumpe evakuiert, um die letzten Ammoniakspuren zu entfernen. Das Vakuum wurde mit sauerstofffreiem Stickstoff gefüllt und nach Zusatz von 100 ml schwefelsaurem Eiswasser das pH durch Bicarbonat und Natronlauge auf 7-8 gebracht und unter einhalten dieses pH so lange tropfenweise Benzoylchlorid zugesetzt, bis sich in einer entnommenen Probe mittels Nitroprussidnatrium kein freies -SH mehr nachweisen ließ. Die wässrige Lösung wurde dann angesäuert, mit Ammonsulfat gesättigt und mit Essigester-Äthanol (1 : 1) so lange ausgeschüttelt, bis eine entnommene Probe keine positive Thioesterreaktion gab. Die organische Phase wurde filtriert und i.V. eingengt, der Rückstand in 30 ml Wasser aufgenommen und 4 Stunden mit Äther-Petroläther (3 : 1) perforiert. Anschließend wurde die wässrige Phase mit Ammonsulfat gesättigt, mit Essigester-Äthanol (1 : 1) der Thioester extrahiert und dann die organische Phase mit gesättigter Ammonsulfatlösung säurefrei gewaschen. Das Lösungsmittel wurde abgezogen, der Rückstand in 3 ml Äthanol aufgenommen, mit 5 ml abs. Essigester versetzt und zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde mit dem Niederschlag noch 2 mal wiederholt. Die filtrierten organischen Phasen wurden eingengt, und der Rückstand über Nacht an der Oelpumpe getrocknet. Es blieben 1,8 g einer gelbbraunen, blasigen Masse (S-Benzoyl-bisnorpentethin-4'-phosphat).

Spektrum: $\epsilon_{241\text{ m}\mu} = 9880$; $\epsilon_{268\text{ m}\mu} = 8750$;
(s. Bild 4, S.22).

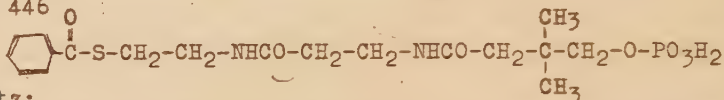
Phosphatanalyse:

Einwaage: 20,7 mg (47,8 μMol) in 2,45 ml Wasser gelöst.
 0,04 ml (0,78 μMol) verascht: $E = 0,316 = 0,7 \mu\text{Mol}$
 0,05 ml (0,97 μMol) verascht: $E = 0,410 = 1,0 \mu\text{Mol}$

Ein Elektropherogramm ergab denselben Lauf, wie S-Benzoyl-bis-nor- α -desoxy-pantethein-4'-phosphat. Daneben fanden sich noch Spuren von anorganischem Phosphat und phosphorylierte Bruchstücke des Moleküls, die bei der Reduktion in flüssigem Ammoniak entstanden waren (s. Bild 8, S. 30).

S-Benzoyl- α -desoxy-pantethein-4'-phosphat

MG = 446



Ansatz:

320 mg S-Benzoyl- α -desoxy-pantethein (ca. 70 %iges Produkt aus Ansatz 2, S. 67) wurden in 10 ml über Phosphor-pentoxyd destilliertem Chloroform gelöst und bei 0°C unter trockenem Stickstoff in eine Lösung von 0,95 ml Pyridin und 0,14 ml Phosphoroxychlorid in 10 ml trockenem Chloroform getropft. Nach 10 Minuten wurde das Kältebad entfernt, die Mischung wurde noch 1/2 Stunde bei Zimmertemperatur belassen und dann auf Eis gegossen. Durch 3 maliges Ausschütteln der wässrigen Phase mit je 10 ml Chloroform und Waschen der Chloroformphasen mit je 10 ml Wasser wurde überschüssiges Pyridin entfernt. Die wässrige Phase wurde durch 20 ml Austauscher (Amberlite IR 120, Säulen- $\varnothing = 1 \text{ cm}$) vom restlichen Pyridin befreit und auf Phosphat analysiert.

Volumen der Lösung: 100 ml

davon entnommen je 0,1 ml = 1,4 μMol Gesamtphosphat
 = 0,7 μMol Esterphosphat

anorg. PO_4 : $E = 0,238 = 0,57 \mu\text{Mol}$

labiles PO_4 : $E = 0,348 = 0,92 \mu\text{Mol}$

Gesamt- PO_4 : $E = 0,478 = 1,34 \mu\text{Mol}$ (= 96 % des eingesetzten POCl_3)

daraus ergeben sich 0,42 μMol Esterphosphat/0,1 ml = 60 % des eingesetzten Alkohols.

Zur Spaltung des gebildeten Pyrophosphats wurde nach dem Einengen der Lösung i. V. auf 100°C erhitzt und dann halbkonzentrierte Schwefelsäure bis zu einer Endkonzentration von 1 n zugesetzt. Nach 7 Min. wurde rasch abgekühlt, mit Ammonsulfat gesättigt und die Lösung mit Phenol extrahiert. Die weitere Verarbeitung erfolgte genau wie auf Seite 69 beschrieben und ergab nach der Gefriertrocknung ein bräunliches sehr zähes Öl.

Ausbeute: 130 mg = 44 % des eingesetzten S-Benzoyl- α -desoxy-pantetheins (Spektrum, S. 27, Bild 7).

Phosphatanalyse:

6,45 mg in 5 ml Wasser gelöst; davon je 0,32 ml = 1,0 μMol

Esterphosphat $d = 1 \text{ cm}; \quad = 478 \text{ mp}$

anorg. PO_4 : $E = 0,056 = 0,000 \mu\text{Mol}$

labiles PO_4 : $E = 0,069 = 0,02 \mu\text{Mol}$

Gesamt PO_4 : $E = 0,339 = 0,975 \mu\text{Mol}$

Daraus, ergeben sich 0,955 μMol Esterphosphat = 95 % theor.

Das Chromatogramm zeigt folgendes Bild:

SS 2043bn, Butanol/Eisessig/Wasser = 50 : 20 : 30

Substanz

Rf-Wert

S-Benzoyl-bisnor- α -desoxy pantetheinphosphat

0,61

S-Benzoyl-bisnor-pantetheinphosphat

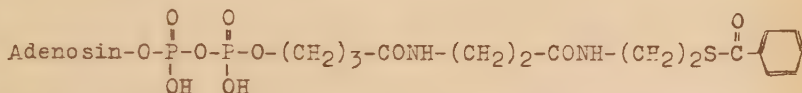
0,65

S-Benzoyl- α -desoxy pantetheinphosphat

0,60 (0,78)

S-Benzoyl-bisnor- α -desoxydephospho-CoA

MG = 747,616



Versuchsansatz:

24 mg AMP (67 μMol) und 23 mg S-Benzoyl-bisnor- α -desoxy pantein-4'-phosphat (56 μMol) wurden in 2 ml Pyridin und 0,4 ml Wasser gelöst. Dazu brachte ich eine Lösung von 1 g (475 μMol) Dicyclohexylcarbodiimid in 1 ml Pyridin und rührte die Lösung mit dem Vibromischer, wobei sich nach 40 Min. feine Kriställchen (Seidenglanz) von Dicyclohexylharnstoff abschieden. Nach 3 Stunden wurden nochmal 0,5 g Dicyclohexylcarbodiimid in 0,5 ml Pyridin und 0,08 ml Wasser zugesetzt und nach einer weiteren Stunde die Reaktion durch Zusatz von 10 ml Wasser beendet. Die Mischung wurde

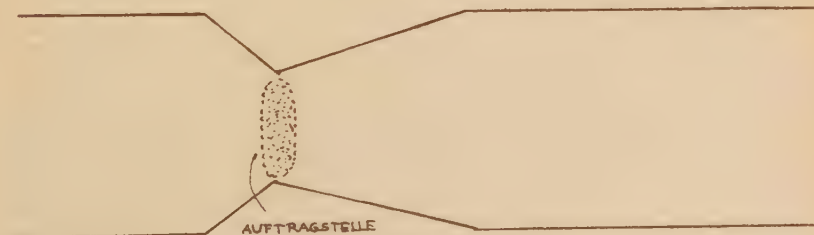


Bild 23. Zugeschnittener Papierstreifen.

filtriert, der Niederschlag 2 mal mit Wasser gewaschen, die vereinigten Filtrate anschließend 3 Stunden mit Äther perforiert und die Lösung bei Zimmertemperatur weitgehend eingengt, nochmal filtriert und papierchromatographiert.

Das Papier wurde zu diesem Zwecke in besonderer Weise zugeschnitten, ähnlich wie es Reindl und Hoppe beschrieben (99).

Dadurch erreichte ich, dass bei einem Gemisch, in dem die einzelnen Komponenten in verschiedenen Konzentrationen vorlagen, keine langen Schwänze entstanden. Ausserdem waren die Rf-Werte genauer zu ermitteln.

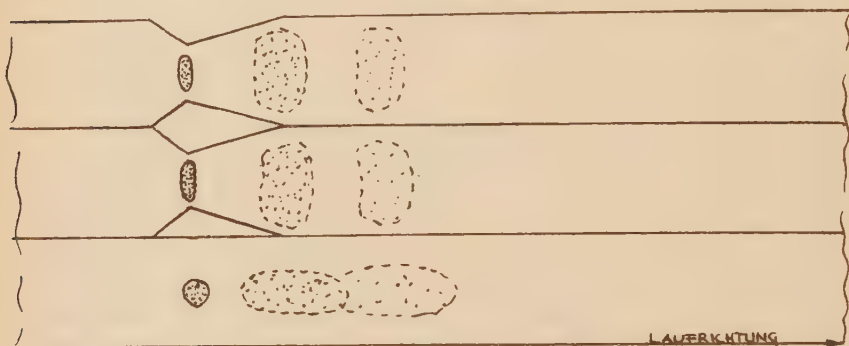


Bild 24. Beispiel eines Papierchromatogramms mit zugeschnittenen und normalen Streifen.

Auf SS 2043b aufgetragen und mit Butanol/Eisessig/Wasser (50 : 20 : 30) chromatographiert, wurde folgende Auftrennung des Gemisches erhalten.

Fleck	1	2	3	4	5
Rf-Wert	0,09	0,27	0,47	0,75	0,87

Nun wurde ein Streifen nach Cramer (85) auf Phosphat entwickelt und dann aus einem zweiten Streifen die entsprechenden Flecken nach einer Schablone ausgeschnitten. Aus einem dritten Streifen, über den nur das Lösungsmittel ohne Substanz gelaufen war, wurde an denselben Stellen ebenfalls Papierstücke nach der Schablone ausgeschnitten. Die jeweils parallelen, mit Substanz belegten und leeren Papierstücke wurden zerschnitten, dann 10 Min. mit m/10 Phosphatpuffer pH 7 eluiert und im Zeiss-Spektralphotometer die Spektren der einzelnen Flecken ausgemessen.

Bild 11 a (s.Seite 39) zeigt die Spektren der Flecken 1, 2 (Adeninspektrum), 3 (S-Benzoyl-CoA-Spektrum) 4 und 5 (Thioesterspektrum), Bild 11 b (s.Seite 39) das genau ausgemessene Spektrum von Fleck 3 mit dem Spektrum des S-Benzoyl-CoA.

Präparativer Ansatz und Isolierung des Reaktionsproduktes.

118,4 mg (280 μ Mol) S-Benzoyl-bisnor- α -desoxy-pantethein-4'-phosphat und 218,6 mg (588 μ Mol) AMP wurden in 6,4 ml Pyridin und 0,96 ml Wasser gelöst, dann eine Lösung von 4,8 g

Jeweils etwa 20 μ mol Adenosin, AMP, S-Benzoyl-bisnor- α -desoxy-pantethein-4'-phosphat und S-Benzoyl-bisnor- α -desoxy-de-

phospho-CoA wurden mit je 1 ml 1 n Salzsäure versetzt und 8 Min. in ein kochendes Wasserbad gestellt. Dann wurde mit je 1 ml 1 n Natronlauge neutralisiert und auf 0,5 ml i.V. eingedampft. Die ausgefallenen Salze (NaCl) wurden abfiltriert und von jeder Probe etwa 3 μ Mol auf Papier (SS 2043b) aufgetragen (vom Dephospho-CoA-analogen etwa 5 μ Mol). Auf denselben Bogen wurden ausserdem jeweils 3 μ Mol Adenosin, AMP und S-Benzoyl-bisnor- α -desoxypantethein-4'-phosphat aufgetragen. Lösungsmittel: Butanol/Eisessig/Wasser = 50 : 20 : 30. Laufzeit : 16 Stunden.

Das Chromatogramm wurde getrocknet. Im UV-Licht wurden folgende Flecken erkannt:

I	Adenosin	Rf	<u>0,34</u>	0,43		
II	Adenosin verseift	RF		<u>0,42</u>		
III	AMP	Rf	<u>0,15</u>	0,43		
IV	AMP verseift	Rf	0,15	<u>0,43</u>		
V	Pantethein-4'-phosphat +)	Rf			<u>0,66</u>	
VI	Pantethein-4'-phosphat verseift ⁺)	Rf			0,66	0,8
VII	Dephospho-CoA verseift ⁺)	Rf	0,15	<u>0,42</u>	<u>0,66</u>	0,8

+) Es handelt sich hier jeweils um die Bisnor- α -desoxyanalogen.

Der Streifen VII wurde der Länge nach halbiert, die eine Hälfte nach Cramer auf Phosphat, die andere mit Nitroprussidnatrium-Ammoniak auf Thioester entwickelt (s.Bild 15, S.44).

Rf-Wert :	0,15	0,34	0,43	0,66	0,8
Phosphat:	+		+	+	
VNP				+	+

Nachweis der freien 1,2-Diolgruppierung am Adenosin.

Folgende Lösungen wurden bereitet:

- 1) Eine 1 %ige wässrige Lösung von Natriumperjodat
- 2) 1 g Rosanilin wurde in 50 ml Wasser gelöst und so lange SO₂ eingeleitet, bis die anfangs rote Lösung farblos war. Dann wurde mit Kohle geschüttelt, filtriert und auf 100 ml aufgefüllt.

Auf einen Papierstreifen wurden nebeneinander in Flecken von etwa 3 cm Durchmesser aufgetragen: AMP, S-Benzoyl-bisnor- α -desoxydephospho-CoA, S-Acetyl-CoA.

Dann wurden die Papierstreifen 5 Min. bei 80°C getrocknet, mit Lösung 1) dünn besprüht und 10 Min. bei Zimmertemperatur belassen.

Nun wurde das Papier in einem Becherglas so lange einer SO_2 -Atmosphäre ausgesetzt, bis alles Jod reduziert war. Darauf wurde mit Lösung 2) besprüht und 10 Min. bei 85 - 90°C getrocknet.

Tiefblauer Fleck bei AMP

blauvioletter Fleck bei S-Benzoyl-bisnor- α -desoxydephospho-CoA

Bei S-Acetyl-CoA erst nach mehreren Stunden ein hellrosa Hof auf dem inzwischen völlig violetten Papier (siehe Bild 16, S.45).

Enzymatische Spaltung des Dephospho-CoA-analogen durch Dephospho-CoA-pyrophosphorylase.

Anreicherung des Enzyms: (nach einer Vorschrift von M.B. Hoagland und G.D. Novelli (95)).

150 g frische Schweineleber wurden bei 0°C mit 150 ml m/15 Kaliumchloridlösung 45 Sekunden im Starmix homogenisiert, dann durch ein Tuch filtriert und das Filtrat bei 0°C und 20000 U/Min. 1 1/2 Stunde zentrifugiert.

Die überstehende Lösung wurde mit Wasser auf 360 ml verdünnt und 21 ml 2 %ige Protaminsulfatlösung eingerührt. Nach dem Zentrifugieren wurde die überstehende Lösung auf pH 8 mit Tris gebracht und anschließend bis zu 20 % Sättigung mit Ammonsulfat versetzt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und die überstehende Lösung bis zu 38 % Sättigung mit Ammonsulfat versetzt. Dieser Niederschlag wurde wiederum abzentrifugiert, in 16 ml Wasser gelöst (93 mg Protein/ml) und auf 30 ml verdünnt.

In dieser Lösung wurden 90 ml Calciumphosphatgel (30 mg Trockengewicht/ml) eingerührt, nach 10 Min. 1/4 Stunde zentrifugiert und das Überstehende mit Tris auf pH 7,8 gebracht. Nun wurde mit Ammonsulfat bis 70 % Sättigung versetzt, der Niederschlag abzentrifugiert und in Wasser gelöst (30 mg Protein/ml). Gesamtvolumen: 18,5 ml. Die Lösung wurde in 4 Portionen geteilt und eingefroren. Für jeden Test wurden 0,1 ml (3 mg Protein) eingesetzt.

Ansatz I: In 2 Reagenzgläser wurden pipettiert (in ml):

	I	II
m/15 Trispuffer pH 8,1 und m/100 Mg-Trilonat	1,0	1,0
m/10 MgCl_2	0,02	0,02
m/10 Pyrophosphat	0,07	0,07
m/10 Cystein-HCl	0,1	0,1
m/10 Fluorid	0,01	0,01
m Glucose	0,05	0,05
S-Benzoyl-bisnor - α -desoxydephospho-CoA	0,12(1 uMol)	0,24(2 uMol)
Pyrophosphorylase ⁺)	0,1	0,1
Hexokinase ⁺⁺)	0,06	0,06
Wasser	0,12	0,00
Endvolumen	1,65 ml	1,65 ml

⁺) 3 mg Protein/0,1 ml

⁺⁺) Präparat aus der Poliklinik, Frau Dr. v. Brand: 0,25 mg Protein/ml

Diese Lösungen wurden 90 Min. bei 28°C inkubiert. Dann wurden von jeder Lösung zwei Proben entnommen, mit m/15 Trispuffer pH 8,1 auf 1,94 ml aufgefüllt, 0,04 ml Zwischenferment⁺) zugesetzt und die Reaktion durch Zusatz von 0,02 ml TPN-Lösung (0,3 µMol) gestartet.

E₀ = Lösung und Zwischenferment; T = 35°C; d = 2 cm;
λ₀ = 366 mµ; E = 0,172 = 0,1 µMol TPNH₂.

Probe	entnommen ml	Dephospho- CoA-analoges µMol	E	TPNH ₂ µMol	%
I	0,32	0,195	0,268	0,152	78
I	0,17	0,11	0,166	0,095	86
II	0,1	0,12	0,182	0,104	86
II	0,25	0,30	0,430	0,246	82

Ansatz II: Dieselben Reagentien, wie Ansatz I, aber mit Wasser auf 2 ml aufgefüllt und in jeder Probe 2 µMol S-Benzoyl-bisnor-α-desoxydephospho-CoA. Den Proben wurden nach der Zeit t 0,2 ml (0,2 µMol Dephospho-CoA-analoges) entnommen und wie bei Ansatz I beschrieben, das gebildete Glucose-6-phosphat gemessen (s. Bild 17, S.46).

t (Min.)	E	µMol TPNH ₂	%
5	0,009	0,005	2
12	0,014	0,008	4
20	0,030	0,017	9
30	0,059	0,034	17
45	0,113	0,064	32
60	0,165	0,095	47
90	0,279	0,159	80
120	0,343	0,196	98

Versuch zur Synthese von S-Benzoyl-bisnor-dephospho-CoA

In einer umgedrehten Bürette wurde trockener Chlorwasserstoff über konz. Schwefelsäure aufgefangen. In einem 25 ml Kolben, der ein bis fast zum Boden reichendes Einleitröhrchen und ein mit CaCl₂ gefülltes Ableitrohr trug, wurden eine Lösung von 200 ml (460 µMol) S-Benzoyl-bisnor-pantethein-4'-phosphat in 7 ml abs. Chloroform und 0,085 ml (1000 µMol) Dihydropyran gebracht.

Nun wurde mit einem Magnetrührer gemischt, 20 ml trockenes HCl-Gas eingeleitet und noch 3 Stunden gerührt. Dann wurden 5 ml trockenes Pyridin zugesetzt und die Lösung i.V. eingeeengt. Auf SS 2043b gegen wassergesättigtes Butanol chro-

⁺) Präparat Frl. G. Stix (100); 25 mg Protein/ml.

matographiert und mit Nitroprussid-Na, NH_3 entwickelt, ergaben sich:

Rf-Wert des Ausgangsproduktes = 0,23
Rf-Wert des Umsetzungsproduktes = 0,32

Dieser Rückstand wurde mit 200 mg AMP in 8,6 ml Pyridin und 1,2 ml Wasser gelöst und nach Zugabe von 7 g Dicyclohexylcarbodiimid in 7 ml Pyridin 4 Stunden heftig gerührt. Darnach wurden nochmal 1,2 g Dicyclohexylcarbodiimid in 1,2 ml Pyridin und 0,24 ml Wasser zugesetzt und erneut 3 1/2 Stunden gemischt. Der Ansatz wurde mit Wasser (30 ml) versetzt, filtriert und 4 Stunden mit Äther perforiert. Ein Chromatogramm auf SS 2043b mit Butanol/ Eisessig/Wasser (50 : 20 : 30) ergab folgende Flecken (s.Bild 19, S.48):

Rf-Wert:	0,08	0,18	0,5	0,7	0,87
	sehr stark	stark	gerade sichtbar	stark	gerade sichtbar
	DAPP	AMP	Bisnorde- ph.-CoA	Bisn.pant. 4ph-Acetal	Dimeres Bisnp.4ph. acetal

Versuch zur Synthese von $\text{S}, \text{O}^{2'}$ -Dibenzyl-dephospho-CoA

100 mg $\text{S}, \text{O}^{2'}$ -Dibenzylpentetidin-4'-phosphat wurden in 4,4 ml Pyridin und 0,8 ml Wasser gelöst. Diese Lösung wurde mit 3,5 g Dicyclohexylcarbodiimid in 3,5 ml Pyridin versetzt und 1/2 Stunde gerührt. Dann wurden im Lauf von 3 Stunden 150 mg AMP in kleinen Portionen dazugebracht. Nochmal mit 1 g Dicyclohexylcarbodiimid in 1 ml Pyridin und 0,12 ml Wasser versetzt, wurde die Lösung weitere 3 Stunden gerührt. Nach Beendigung der Reaktion und Aufarbeitung wie Seite 73 beschrieben, ergab ein Chromatogramm folgende Flecken:

Rf-Wert:	0,09	0,20	0,69	0,83
Phosphatanalyse nach Cramer (85)	stark	stark	sehr schwach	stark
S mit Permanganat entwickelt	-	-	schwach	stark
			$\text{S}, \text{O}^{2'}$ -Dibenzyl dephospho-CoA	$\text{S}, \text{O}^{2'}$ -Dib. pent.4'ph.

Versuch zur Phosphorylierung des S-Benzoyl-bisnor- α -desoxy-dephospho-CoA mit ATP (Dephospho-CoA-kinase)

1) Die aus Schweineleber angereicherte Enzymfraktion (siehe S.77) enthält auch Dephospho-CoA-kinase. Von dieser Lösung wurden 0,1 ml (3 mg Protein) eingesetzt (Ferment I).

2) Nach einer Vorschrift von T.P.Wang (93) wurde aus Taubenleberacetonepulver Dephospho-CoA-kinase angereichert: 1 g Taubenleberacetonepulver wurde mit 11 ml eiskalter 0,02 m Kaliumbicarbonatlösung extrahiert und zentrifugiert. Der Überstand (10 ml) wurde mit 24 ml 0,2 %iger Protaminsulfatlösung in 0,04 m Trispuffer pH 7,5 versetzt und der Niederschlag zentrifugiert. Zum Überstehenden (32 ml) wurden 26 ml auf -15°C gekühltes Aceton langsam zugetropft und

zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 9 ml m Trispuffer pH 8,2 aufgenommen (6 mg Protein/ml) und 6 Stunden gegen 2 Liter einer Lösung von 0,2 % NaCl und 0,02 m Kaliumbicarbonat dialysiert. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und die überstehende Lösung (10 ml, 3,7 mg Protein/ml) langsam mit 4,7 g Ammonsulfat versetzt und noch 1 Stunde gerührt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und in 1,2 ml 0,2 %iger Kaliumchloridlösung aufgenommen (23 mg Protein/ml). Von dieser Lösung wurde ebenfalls 0,1 ml (2,3 mg Protein) eingesetzt (Ferment II).

Ansatz:

Probe

m/2 Trispuffer ph 8,1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
m/10 MgCl ₂	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
m/10 Cystein HCl ...	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
m/20 ATP	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Wasser	0,49	0,59	0,39	0,49	0,59
S-Benzoyldephospho-CoA	2 uMol	-	2 uMol	2 uMol	-
S-Benzoyl-bisnor- α -desoxy-dephospho-CoA	-	2 uMol	2 uMol	-	2 uMol
Ferment II	-	-	-	0,1	0,1
Ferment I	0,1	0,1	0,1	-	-

Gesamtvolumen:	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
----------------	------	------	------	------	------

Die Proben wurden 3 Stunden bei 20°C inkubiert, dann mit je 1 ml Amberlite IR 120 (H⁺-Form) versetzt und 10 Minuten geschüttelt. Nach dem Abfiltrieren wurde der Austauscher 2 mal mit je 1 ml Wasser gewaschen, die Waschflüssigkeit mit den entsprechenden Filtraten vereinigt und die Proben lyophilisiert.

Die Rückstände wurden mit 0,2 ml Wasser versetzt und mit verdünnter Natronlauge neutralisiert.

Die neutralen Lösungen wurden mittels Papierelektrophorese analysiert. (Daneben wurde als Vergleich noch S-Benzoyl-CoA aufgetragen.) pH 6,4; Pyridinacetatpuffer; 36 V/cm; 60 - 70 mA; t = 2 Stunden (siehe Bild 21, S.52).

Probe	1	2	3	4	5	Benzoyl-CoA
cm Laufstrecke	8,5	7,5	7,5-8,5	8,5	7,5	8,5

Zusammenfassung

Aus γ -Butyrolakton, α -Oxy- γ -butyrolakton und β,β -Dimethyl- γ -butyrolakton wurden über die Stufen der α -Desoxy-bisnor- α -Desoxy- und Bisnorpantothensäure nach verschiedenen Methoden die entsprechenden Analogen des Pantetheins in Form ihrer S-Benzoylderivate hergestellt. Dabei konnten S-Benzoyl-bisnor- α -desoxy- und S-Benzoyl-bisnor-pantethein in kristallisierter, analysenreiner Form erhalten werden.

Weiterhin wurden die Pantetheinanalogen in 4'-Stellung phosphoryliert und damit die Analogen des Pantethein-4'-phosphats gewonnen, von denen sich S-Benzoyl-bisnor- α -desoxypantethein-4'-phosphat ebenfalls kristallisieren ließ.

Die folgende Umsetzung der Analogen des Pantethein-phosphats mit AMP zu Analogen des Dephospho-CoA gelang in befriedigender Weise nur bei dem Bisnor- α -desoxyderivat. Für den Nachweis, die Isolierung und den Strukturbeweis des synthetisierten Produktes wurden geeignete Methoden ausgearbeitet. Dabei gelang es, das S-Benzoyl-bisnor- α -desoxydephospho-CoA in recht reiner Form (95 %) zu erhalten und seine Struktur zu sichern. Die ausserdem versuchte enzymatische Phosphorylierung dieser Verbindung zum Analogen des Coenzym-A blieb erfolglos.

In den anschließend vorgenommenen enzymatischen Messungen wurde die Affinität der hergestellten Verbindungen mit der der natürlichen Produkte verglichen. Dabei ergab sich die große Bedeutung der Pantoylsäure für die β -Oxyacyldehydrogenase- und Dephospho-CoA-kinasereaktion. Bei der Crotonasereaktion lässt das Ergebnis darauf schließen, dass das Adenosinphosphat der wichtigste Vermittler an das Enzym ist, während bei der Thiolasereaktion vorallem dem β -Alanin diese Funktion im Enzym-Substrat-Komplex zuzukommen scheint.

Literatur-Verzeichnis

- 1) O.Warburg, W.Christian, Naturw.20, 980 (1932)
- 2) O.Warburg, W.Christian, Bioch.Z. 254, 438 (1932); 258, 496
(1933)
- 3) R.Kuhn, P.György, Th.Wagner-Jauregg, Ber.66, 1034 (1933)
- 4) D.D.Woods, Brit.J.Exptl.Path. 21, 74 (1940)
- 5) E.E.Snell, J.Biol.Ch. 154, 313 (1944)
- 6) E.E.Snell, J.am.chem.Soc. 66, 2082 (1944)
- 7) W.W.Umbreit, J.C.Gunsalus, J.Biol.Ch.179, 279 (1949)
- 8) F.Schlenk, E.E.Snell, J.Biol.Ch. 157, 425 (1945)
- 9) A.E.Braunstein, M.M.Shemyakin, Biokhimiya 18, 393 (1953)
- 10) D.W.Wooley, H.A.Waisman, C.A.Elvehjem, J.Biol.Chem. 129,
673 (1939)
- 11) P.György, C.E.Poling, Y.Subbarrow, J.Biol.Ch. 115, 557 (1936)
- 12) P.György, J.Am.Chem.Soc. 60, 983 (1938)
- 13) E.E.Snell, G.M.Brown, Adv. Enzym. 14, 49 (1953)
- 14) D.Nachmansohn, M.J.Bermann, J.Biol.Ch. 165, 551 (1946)
- 15) F.Lipmann, N.O.Kaplan, J.Biol.Ch. 160, 173 (1946); 162, 743
(1946)
- 16) F.Lipmann, N.O.Kaplan, G.D.Novelli, G.Tuttle, J.Biol.Ch.
167, 869 (1947)
- 17) F.Lynen, E.Reichert, L.Rueff, Ann.Chem.547, 1 (1951)
- 18) H.A.Krebs, H.L.Kornberg, Erg. Physiol. 49, 212 (1957)
- 19) F.L.Crane, S.Mii, J.G.Hauge, D.E.Green, H.Beinert,
J.Biol.Ch. 218, 701 (1956)
F.L.Crane, J.G.Hauge, H.Beinert, Bioch.Acta 17, 293 (1955)
- 20) F.Lynen, K.Decker, Erg.Physiol. 49, 327 (1957)
- 21) O.Wieland, F.Lynen, Meth. Enz. I, 566 (1955)
- 22) W.Seubert, Dissertation München (1955)
- 23) E.R.Stadtman, F.Lipmann, G.D.Novelli, J.Biol.Ch. 191
365 (1951)
- 24) T.Reichstein, A.Grüssner, Helv.Chim.Act. 23, 650 (1940)
- 25) H.K.Mitchell, H.H.Weinstock, E.E.Snell, R.J.Williams,
J.Am.Ch.Soc. 62, 1776 (1940)
- 26) H.H.Weinstock, J.Biol.Ch. 135, 343 (1940)
- 27) N.O.Kaplan, M.M.Ciotti, J.Am.Ch.Soc. 76, 1713 (1954);
J.Biol.Ch. 221, 823 (1956)
- 28) D.E.Hughes, Bioch.J. 57, 485 (1954)
- 29) P.Karrer, T.H.Quibell, Helv.Ch.Act. 19, 1034 (1936)
- 30) H.Klenow, E.Lichter, Bioch.Act. 23, 6 (1957)
- 31) H.Klenow, B.Andersen, Bioch.Act. 23, 92 (1957)

- 32) J.v.Eys, N.O.Kaplan, Bioch.Act. 23, 574 (1957)
- 33) K.Wallenfels, H.Sund, Bioch.Z. 329, 17 (1957)
- 34) D.E.Methler, M.Ikawa, E.E.Snell, J.Am.Ch.Soc. 76, 648
(1954)
- 35) R.J.Williams, Adv.Enzym. III, 253 (1943)
- 36) J.W.Barnett, F.A.Robinson, Bioch.J. 36, 357 (1942)
- 37) J.W.Barnett, Bioch.J. 36, 364 (1942)
- 38) R.J.Williams, H.K.Mitchell, H.H.Weinstock, E.E.Snell
J.Am.Ch.Soc. 62, 1784 (1940)
- 39) R.Kuhn, Th.Wieland, Ber. 73, 971 (1940)
- 40) E.T.Stiller, S.A.Harris, J.Finkelstein, C.Keresztesy,
K.Folkers, J.Am.Ch.Soc. 62, 1785 (1940)
- 41) S.H.Babcock, T.H.Jukes, J.Am.Ch.Soc. 62, 1628 (1940)
- 42) J.W.Barnett, J.Chem.Soc. 5 (1944)
- 43) E.H.Wilson, J.Weijlard, M.Tischler, J.Am.Ch.Soc. 76
7177 (1954)
- 44) J.E.Livak, E.C.Britton, J.C.van der Weele, M.F.Murray
J.Am.Ch.Soc. 67, 2218 (1945)
- 45) A.C.J.Opfermann, Brit.Pat. 688253
- 46) J.U.Nef, Ann.Chem. 376, 31 (1910)
- 47) J.W.E.Glattfeld, J.Am.Ch.Soc. 43, 2675 (1921)
- 48) J.Baddiley, E.M.Thain, J.Chem.Soc. 1610 (1953)
- 49) Th.Curtius, H.Franzen, Ber. 35, 3236 (1902)
- 50) H.Staudinger, A.Gaute, Ber. 49/II, 1906 (1916)
- 51) T.Reichstein, Helv.Ch.Act. 9, 799 (1926)
- 52) G.Komppa, Ber. 32, 1421 (1899)
- 53) H.Windaus, F.Klänhardt, Ber. 54, 587 (1921)
- 54) S.S.G.Sircar, J.Chem.Soc. 901 (1928)
- 55) H.Hunsdiecker, Cl.Hunsdiecker, Ber. 75, 291 (1942)
- 56) F.C.Whitemore, A.H.Popkin, H.J.Bernstein, J.F.Wilkins
J.Am.Ch.Soc. 63, 124 (1941)
- 57) M.C.Bender, H.Robbins, J.Am.Ch.Soc. 78, 1699 (1956)
- 58) A.Franke, Monatsh. 34, 1893 (1913)
- 59) Org.Synth. 31, 40 (1951)
- 60) F.L.M.Pattison, B.C.Saunders, J.Chem.Soc. 2746 (1949)
- 61) R.Schwyzer, Helv.Ch.Act. 35, 1903 (1952)
- 62) R.Schwyzer, Helv.Ch.Act. 36, 414 (1953)
- 63) F.Lynen, Ann.Chem. 574, 33 (1951)
- 64) Th.Wieland, E.Bokelmann, Naturw. 38, 384 (1951)
- 65) F.R.Atherton, H.T.Openshaw, A.R.Todd, J.Chem.Soc. 382
(1945)
- 66) K.Beaucamp, Diplomarbeit 1956, München

- 67) R.W.Chemberg, J.G.Moffat, H.G.Khorana, J.Am.Ch.Soc. 79,
3747 (1957)
- 68) F.Lynen, I.Lerch, L.Rueff, unveröffentlichte Arbeiten
- 69) R.Grunert, P.H.Philips, Arch.Bioch. 30, 217 (1951)
- 70) G.D.Novelli, F.J.Schmetz, N.O.Kaplan, J.Biol.Ch.206, 533
(1954)
- 71) L.Lewitnow, G.D.Novelli, J.Biol.Ch. 207, 761 (1954)
- 72) A.Kornberg, J.Biol.Ch. 182, 779 (1950)
- 73) M.E.Jones, F.Lipmann, H.Hilz, F.Lynen, J.Am.Chem.Soc. 75,
3285 (1953)
- 74) A.Munch-Peterson, H.M.Kalckar, E.E.Smith, E.Catulo,
Nature 172, 1036 (1953)
- 75) E.P.Kennedy, S.B.Weiss, J.Biol.Ch. 222, 185 (1956)
- 76) H.G.Khorana, Chem.Rev. 53, 145 (1953)
- 77) S.M.H.Christie, D.T.Elmore, G.W.Kenner, A.R.Todd,
J.Chem.Soc. 2947 (1953)
- 78) H.G.Khorana, A.R.Todd, J.Chem.Soc. 2257 (1953)
- 79) H.G.Khorana, J.Am.Ch.Soc. 76, 3517 (1954)
- 80) H.G.Khorana, C.A.Dekker, J.Am.Ch.Soc. 76, 3522 (1954)
- 81) H.G.Khorana, R.H.Hall, J.Am.Ch.Soc. 76, 5056 (1954)
- 82) G.W.Kenner, A.R.Todd, R.F.Webb, J.Chem.Soc. 2843 (1954)
- 83) F.M.Huennekens, G.L.Kilgour, J.Am.Ch.Soc. 77, 6716 (1955)
- 84) E.P.Kennedy, S.B.Weiss, J.Biol.Ch. 222, 193 (1956)
- 85) F.Cramer, Chromatographie, S.81
- 86) R.B.Hurlbert, H.Schmitz, A.F.Brumm, V.R.Potter,
J.Biol.Ch. 209, 23 (1954)
- 87) W.E.Cohn, J.Am.Ch.Soc. 72, 1471 (1950)
W.E.Cohn, E.Volkin, J.Biol.Ch. 203, 319 (1953)
- 88) W.E.Cohn, E.Volkin, Bioch.Act. 24, 359 (1957)
- 89) J.G.Buchanan, C.A.Dekker, A.G.Long, J.Chem.Soc.
3162 (1950)
- 90) G.F.Woods, D.N.Kramer, J.Am.Ch.Soc. 69, 2246 (1947)
- 91) B.Iselin, R.Schwyzer, Helv.Ch.Act. 39, 57 (1956)
- 92) W.Gruber, Dissertation München, in Vorbereitung
- 93) T.P.Wang, Meth. Enzym. II, [110] 649
- 94) T.P.Wang, L.Shuster, N.O.Kaplan, J.Biol.Ch. 206, 299 (1954)
- 95) M.D.Hongland, G.D.Novelli, J.Biol.Ch. 207, 767 (1954)
- 96) M.Grassl, Dissertation München 1957
- 97) K.Decker, Dissertation München 1955
- 98) M.Martland, R.Robinson, Bioch.J. 20, 848 (1926)
- 99) F.Reindl, W.Hoppe, Naturw. 40, 245 (1953)
- 100) G.Stix, Diplomarbeit München 1956

Lebenslauf

Am 22. November 1927 wurde ich, Klaus Beaucamp, als Sohn des Augenarztes Dr. Cola Beaucamp und seiner Frau Dora, geb. v. Hoeßlin in München geboren. 1932 zogen meine Eltern nach Weilheim (Obb.), wo ich die Volks- und Oberschule besuchte. Im Herbst 1944 wurde ich zu Arbeitsdienst und Militär eingezogen. 1946 konnte ich die Schule wieder besuchen und machte 1948 in Starnberg das Abitur. Im selben Jahr begann ich an der Universität München das Studium der Chemie. Im Juli 1952 bestand ich das Vordiplom- und im Februar 1955 das Diplomexamen. Anschließend begann ich bei Herrn Professor Dr. F. Lynen meine Diplomarbeit, „Analoge des Pantetheins und des Pantetheinphosphats“, die ich im April 1956 abschließen und in der vorliegenden Doktorarbeit fortführen und erweitern konnte.

